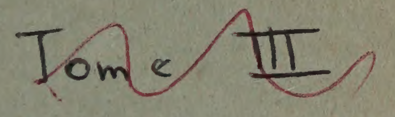
Ire Année. — No 1. *(Trimestriel).* Janvier-Février-Mars 1959

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE

ANNALES DE L'INSTITUT NATIONAL
DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE

SÉRIE A bis

ANNALES DE PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE





INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
7, rue Keppler – Paris

AVIS AUX LECTEURS

Des modifications importantes sont apportées pour l'année 1959 aux Annales de l'Institut National de la Recherche Agronomique, en vue de mieux adapter l'ensemble de ces publications aux besoins des lecteurs. D'une part, une série nouvelle vient d'être créée : la série A *bis*, consacrée à la Physiologie Végétale qui paraîtra 4 fois par an. D'autre part, dans les autres séries, le nombre moyen de pages a été augmenté. Désormais, les Annales de l'Institut National de la Recherche Agronomique comprendront les séries suivantes :

Série A — **ANNALES AGRONOMIQUES.** — Agronomie générale et science du sol — couverture crème — 6 fascicules par an d'environ 120 pages.

Série A bis — **ANNALES DE PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE.** — Couverture bleue — 4 fascicules par an d'environ 50 pages.

Série B — **ANNALES DE L'AMÉLIORATION DES PLANTES.** — Couverture verte — 4 fascicules par an d'environ 120 pages.

Série C — **ANNALES DES ÉPIPHYTIES.** — Couverture rouge — 4 fascicules par an d'environ 120 pages.

Série C bis — **ANNALES DE L'ABEILLE.** — Couverture ocre — 4 fascicules par an d'environ 80 pages.

Série D — **ANNALES DE ZOOTECHNIE.** — Couverture jaune — 4 fascicules par an d'environ 80 pages.

Série E — **ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE.** — Couverture grise — 4 fascicules par an d'environ 120 pages.

(Voir en page 3 de la couverture les conditions nouvelles d'abonnement).

Les commandes d'ouvrages doivent être adressées au Régisseur des publications, 149, rue de Grenelle, Paris-VIIe.

Règlement : par chèque bancaire à l'ordre du Régisseur des publications, par virement postal, à son compte courant : Paris 9064-43 ou par bons U. N. E. S. C. O.

ANNALES
DE
L'INSTITUT NATIONAL
DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE

ANNALES DE L'INSTITUT NATIONAL
DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE

SÉRIE A^bis

ANNALES DE PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE

Année 1959



INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
7, rue Keppler – Paris



AVANT-PROPOS

On peut dire sans aucune exagération que toute production agricole, qu'on la considère sous son aspect quantitatif ou sous son aspect qualitatif, dépend de la façon dont sont utilisés les éléments que le végétal emprunte au milieu extérieur et dont il réagit aux divers composants de ce milieu, c'est-à-dire, en définitive, du plus ou moins bon rendement de ses diverses fonctions.

La Physiologie végétale est la Science qui étudie ces fonctions, leurs relations mutuelles et leurs rapports tant avec la constitution génétique du végétal qu'avec le milieu. L'Agriculture étant l'exploitation, au profit des besoins de l'homme, des processus physiologiques dont le végétal est le siège, on peut dire que tout progrès dans nos connaissances en ce domaine est susceptible d'applications pratiques tendant à l'amélioration des techniques agricoles.

Aussi bien les premiers « Agronomes » ont-ils été, avant tout, des Physiologistes ; il suffit, à cet égard, de citer les noms de DUHAMEL DU MONCEAU, de LAVOISIER, de BOUSSAINGAULT.

Les premières Annales agronomiques, *celles de* DEHERAIN, *de 1875 à 1902, puis les* Annales de la Science agronomique *de* GRANDEAU *ont fait une part très importante à des mémoires de Physiologie végétale.*

Cependant, les progrès réalisés en matière de Science du Sol depuis le début de ce siècle, grâce notamment aux connaissances acquises sur les minéraux, sur les colloïdes et sur certains processus microbiologiques, ont orienté beaucoup d'agronomes vers l'étude des phénomènes dont le sol est le siège. Nos connaissances sur la dynamique de l'eau et des éléments minéraux, dans le sol, se sont précisées et l'étude de ces problèmes s'est développée beaucoup, au détriment des travaux proprement physiologiques, limités souvent à quelques aspects de la nutrition minérale des plantes. L'Agronomie est devenue, de plus en plus, la discipline ayant pour objet l'étude du sol et des problèmes de fertilisation.

Les progrès de la Chimie biologique, de la Physico-chimie et de leurs techniques d'investigation, la découverte des hormones végétales, puis des substances de croissance synthétiques, la reconnaissance des lois qui président, chez les végétaux, à la croissance et au développement, ont, plus récemment, remis en honneur les recherches de Physiologie végétale — et ceci, d'autant

plus que certaines applications agricoles spectaculaires en ont, s'il en était besoin, démontré à nouveau l'intérêt.

On peut dire qu'actuellement, aucune discipline agronomique ne peut progresser sans poursuivre des études de Physiologie végétale.

Ceci est vrai aussi bien de l'Amélioration des plantes, de la Pathologie végétale ou même de la Zoologie agricole ou de la Technologie des produits végétaux, voire de la Zootechnie, que de la Bioclimatologie ou de l'Agronomie proprement dite. Pour ne prendre qu'un exemple, l'établissement et l'exploitation rationnels des prairies doivent tenir compte, pour le choix des espèces et des variétés à semer, pour le mode et le rythme d'exploitation à adopter, pour les fumures à apporter, pour la conduite même des troupeaux, de données physiologiques.

Aussi, dès la création de l'Institut national de la Recherche agronomique, en 1946, la Physiologie végétale avait-elle été prévue comme l'une des disciplines scientifiques de base. Mais c'est seulement en 1950, qu'a pu être créée à Versailles une Station centrale de Physiologie végétale et que des moyens autonomes, en personnel et en matériel, ont pu commencer à lui être accordés. C'est, d'ailleurs, à peu près vers la même époque que l'on a assisté, dans notre pays, à un développement général des recherches de Physiologie végétale.

Pendant quelques années encore, la publication des travaux effectués dans ce domaine par les chercheurs de l'I. N. R. A. a été assurée par les Annales agronomiques *ou parfois d'autres séries des Annales de l'I. N. R. A. En 1957 et 1958, deux fascicules annuels consacrés à cette discipline ont paru en supplément des* Annales agronomiques.

Le moment est venu maintenant de donner à la Physiologie végétale la place qui lui revient dans les publications périodiques de l'I. N. R. A. Le présent fascicule est le 1er de la série Annales de Physiologie végétale *de nos Annales. Cette série comprendra, dès 1959, 4 fascicules.*

Comme il est de règle aux Annales de l'I. N. R. A., la nouvelle série ne publiera pas seulement des notes, des mémoires ou des mises au point émanant de chercheurs de notre Institut. Les Annales de Physiologie végétale *sont largement ouvertes à tous les auteurs, français ou de langue française, dont nous serons heureux de publier les travaux, marquant ainsi d'une façon concrète les liens de collaboration scientifique et amicale qui se sont établis, au cours de ces dernières années, entre eux et les physiologistes de la Recherche agronomique française.*

J. BUSTARRET
Inspecteur général
de la Recherche agronomique.

COMPTE-RENDU DES TRAVAUX ACCOMPLIS PAR LA STATION DE PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE DE 1950 A 1956

PAR

Y. COÏC

INTRODUCTION

A la fin de l'année 1949, Y. Coïc, Directeur de la Station Agronomique de Quimper, a été muté au Centre National de Recherches Agronomiques de Versailles pour constituer un Laboratoire de Physiologie Végétale, embryon d'une future Station Centrale de Physiologie Végétale dont la création était prévue par la loi du 18 mai 1946. D'autres chercheurs dont certains travaux étaient plus particulièrement orientés vers la Physiologie Végétale étaient associés à cette œuvre. Ainsi, G. Morel était appelé à diriger le laboratoire des substances de croissance, au retour, en 1950 d'un stage à l'Université de Harvard, chez le Professeur W. K. Thimann. G. Ducet, qui travaillait alors sur la respiration terminale des végétaux, entrait dans cette discipline, ainsi que R. Longchamp à qui l'on avait demandé de s'occuper des problèmes posés par le désherbage sélectif des céréales.

Évolution des moyens dont a disposé la discipline Physiologie Végétale.

Installation. — Le petit noyau de chercheurs réunis en 1950 dans la discipline « Physiologie Végétale » appartenait à l'origine à deux disciplines : l' « Agronomie » et la « Pathologie Végétale ». Ils continuèrent à travailler dans les bâtiments affectés à ces disciplines.

Il eût été désirable que l'on construisît assez rapidement des laboratoires et des serres pour permettre un développement normal de la discipline. Ceci n'a été possible qu'à partir de 1956. Deux serres ont été mises en fonctionnement au début de 1958 et les nouveaux laboratoires seront achevés seulement à la fin de 1958. De ce fait, le développement modeste de la discipline Physiologie Végétale n'a pu se faire pendant les

premières années que grâce à la compréhension et à l'aide des directeurs centraux des disciplines qui hébergeaient précédemment ces chercheurs.

Matériel. — Par contre, l'équipement en matériel scientifique a été convenable. Il s'est effectué au fur et à mesure du recrutement des chercheurs et techniciens. Nous avons pu ainsi, grâce aux crédits accordés et aussi parfois grâce à l'habileté technique de quelques-uns de nos techniciens, utiliser les techniques modernes indispensables aux recherches de Physiologie Végétale.

Personnel. — De 1950 à 1956, le personnel de la Station est passé de quatre scientifiques à huit scientifiques titulaires, 4 contractuels scientifiques et 13 techniciens. Le recrutement a été principalement effectué parmi les ingénieurs agronomes et les ingénieurs agricoles.

Organisation de la discipline et Orientation des Recherches. — La Discipline ne comporte qu'une Station au Centre National de Recherches Agronomiques de Versailles. Nous désirons qu'elle soit étoffée le plus possible avant qu'il soit créé des Stations de Physiologie dans les Centres Régionaux.

Avant la création à l'I. N. R. A. d'une discipline autonome de Physiologie Végétale, bien des chercheurs appartenant à diverses disciplines s'intéressaient dans leurs recherches à la Physiologie de nos plantes cultivées. Ainsi, dans la discipline « Agronomie et Biochimie végétale », la nutrition minérale des plantes cultivées a fait l'objet de nombreux travaux. La « Bioclimatologie agricole » s'intéresse à divers aspects de la physiologie de la plante. L'étude de la croissance et du développement des plantes cultivées est fondamentale pour les chercheurs de la « Génétique et Amélioration des plantes ». La « Pathologie Végétale » est intéressée par des problèmes de physiologie phytopathologique, par exemple : physiologie des plantes atteintes de virus. Pour la « Technologie des produits végétaux », la variation de la composition de ces produits a une telle importance que cette discipline est automatiquement amenée à s'occuper de problèmes de physiologie végétale (étude de la maturation du raisin, par exemple).

Nous avons essayé d'aider nos collègues d'autres disciplines ayant besoin de mieux connaître certains aspects de la physiologie des plantes cultivées, et contribué à coordonner les efforts de tous ceux qui font de la Physiologie Végétale, à quelque discipline qu'ils appartiennent.

Ce désir, considéré comme nécessité, de coordination entre les activités de chercheurs physiologistes de diverses disciplines, n'a pu évidemment se traduire, entre 1950 et 1956, par beaucoup de résultats tangibles. Ceci s'explique surtout par la faible puissance de la Station de Physiologie Végétale pendant cette période, mais nous avons des raisons de penser que cette coopération et cette coordination se concrétiseront au cours des prochaines années.

La formation du personnel est un problème particulièrement important. Nous avons fait appel à des laboratoires extérieurs à l'I. N. R. A. pour la formation en certaines spécialités.

La Recherche en Physiologie Végétale nécessite l'emploi de techniques modernes et nous nous sommes efforcés de rendre nos jeunes chercheurs aptes et à même de s'en servir (emploi des radio-isotopes, chromatographie, etc.).

La Physiologie Végétale, dans le cadre de l'I. N. R. A., a comme objectif final la production agricole. Mais il est bien évident que cet objectif n'enlève rien à la nécessité d'avoir une formation scientifique, de traiter les problèmes dans un esprit scientifique, d'utiliser les méthodes et techniques que la science met à notre disposition.

Nous pensons, et sommes déjà organisés dans cette voie, qu'il est nécessaire d'effectuer :

1° Des recherches fondamentales : pour pouvoir disposer des données scientifiques de base nécessaires à la solution rationnelle de certains problèmes intéressant la production végétale et la qualité de cette production.

2° Des recherches d'ordre pratique : qui sont, soit des recherches sur l'application aux problèmes agricoles ou horticoles de résultats obtenus lors de recherches fondamentales, soit des recherches directement orientées vers l'étude de problèmes posés intéressant l'Economie rurale.

En réalité, les possibilités d'applications pratiques des recherches de Physiologie Végétale dépendent beaucoup d'un état d'esprit : la volonté d'être utile à l'Agriculture. Nous veillons donc particulièrement à la formation scientifique de nos jeunes chercheurs, formation qui doit se traduire par des résultats dans la recherche physiologique fondamentale. Puis nous nous efforçons de créer l'état d'esprit rendant possibles et efficaces les applications agronomiques.

Évolution de l'orientation des travaux. Résultats obtenus.

En raison de la dispersion des laboratoires, de la structure administrative donnée à la Station, des difficultés de recrutement entre 1950 et 1956, les travaux de la Station se sont principalement cristallisés autour des quatre premiers chercheurs réunis en 1950 dans la discipline. D'autres travaux correspondant au stade de formation des jeunes chercheurs ont été effectués chez des personnalités scientifiques que nous tenons à remercier vivement ici : M. WURMSER, Directeur du Laboratoire de Physico-chimie biologique, rue Pierre Curie à Paris, et M. DERVICHIAN, Chef de Service à l'Institut Pasteur.

LABORATOIRE DE NUTRITION MINÉRALE ET DE RECHERCHES SUR LA QUALITÉ (Y. COÏC)

Évolution des travaux.

Arrivé en novembre 1949 à Versailles, nous avons voulu d'abord achever les Recherches entreprises à la Station Agronomique de Quimper avec le personnel de cette Station.

Nous avions trouvé dans les sols très humifères de Bretagne, amenés à pH au-dessus de 6,5 environ, des carences en manganèse sur céréales. Nous avons donc continué avec M. COPPENET, pendant deux années, des travaux sur les relations entre la physiologie de la plante et l'absorption du manganèse en sol carencé, et l'étude de l'évolution d'un oligo-élément comme le manganèse au cours de la croissance et du développement d'une plante (pomme de terre).

D'autre part, en Bretagne, l'eau ne pouvant être considérée comme facteur limitant le rendement du blé d'hiver, nous nous étions demandé pourquoi les rendements en grains étaient aussi peu élevés. Toutes sortes de considérations nous amenèrent à penser que la nutrition azotée devait être en cause.

Il nous est vite apparu que d'une part, il était nécessaire d'entreprendre l'étude de la nutrition azotée du blé d'hiver d'un point de vue général et, d'autre part, que le premier problème, celui des « besoins en azote » d'un blé était une question de Physiologie Végétale appliquée à l'Agronomie. Constatant, chemin faisant, l'importance que pouvait avoir pour l'Agriculture, l'application de telles recherches, elles ont été poursuivies constamment depuis 1950. Il nous était, de plus, agréable de montrer combien la Physiologie Végétale, chère aux anciens Agronomes, était nécessaire pour résoudre rationnellement certains problèmes de fertilisation.

Dès le début de la création du laboratoire de Physiologie Végétale, un problème nous intéressait spécialement : celui de la *qualité* des produits récoltés, car nous pensons que la Physiologie Végétale doit apporter dans ce domaine une contribution primordiale. Il ne nous a pas encore été possible (manque de laboratoires, de personnel) de créer la section Physiologie-Biochimie Végétale qui nous aurait permis, en collaboration avec d'autres disciplines (Bioclimatologie, Amélioration des plantes, Agronomie, Technologie Végétale...), d'organiser rationnellement les recherches sur la « qualité », conçue comme l'adaptation, aux besoins des utilisateurs. Toutefois, personnellement, comme corollaire à nos recherches

sur la nutrition et la fertilisation azotée du blé d'hiver, nous nous sommes préoccupés de la valeur nutritionnelle et meunière-boulangère du blé.

D'un point de vue général, nous avons toujours saisi l'occasion, lors de Conférences Internationales, de souligner l'importance des Recherches de Physiologie Végétale pour résoudre les problèmes de qualité (Congrès International des Industries Agricoles de Rome en 1952, de Madrid en 1954 ; Journées de la qualité (Maison de la chimie) en 1956 ; Symposium de Côme 1957 ; Congrès International de la Nutrition, Paris 1957). En particulier, la qualité des produits servant de matière première aux Industries Agricoles étant souvent plus facile à définir, nos premiers efforts se sont portés dans cette voie. Le besoin en azote de la betterave nous a également préoccupés.

Nous avons aussi commencé une étude du problème du besoin en acide phosphorique et en potasse, et à définir certains principes devant permettre d'établir une nutrition rationnelle en ces éléments.

Nous avons toujours pensé que nous devions orienter une partie de notre activité vers la physiologie cellulaire si nous voulions bien comprendre certains processus physiologiques : ce qui se passe dans la cellule du parenchyme foliaire d'une plante rejaillit obligatoirement sur des phénomènes qui, au premier abord, semblent en être assez éloignés (absorption des ions, fixation et accumulation sélectives, antagonismes). C'est ainsi que nous avons été amenés à nous intéresser aux particules fonctionnelles de la cellule chlorophyllienne (chloroplastes, mitochondries) et à travailler, du point de vue technique, sur leur séparation, ce qui nous a permis d'entreprendre des travaux sur des sujets intéressant l'Agronomie (antagonisme K-Mg, acides nucléiques de la cellule, renouvellement du phosphore dans la cellule, etc...).

Résultats obtenus

I. — La carence en manganèse dans les sols humifères de Bretagne.

Ce travail a permis :

1° De bien fixer les conditions d'apparition de la carence en manganèse dans les sols humifères de Bretagne :

a) le pH critique : on peut situer environ à 6,5 le seuil de pH au-dessus duquel dans ces terres très humifères nous rencontrons des symptômes manifestes de carence en manganèse sur plantes sensibles telles que avoine et blé.

b) La teneur critique en Mn échangeable : on peut fixer à environ 1 mg par kg de terre fine la teneur au-dessous de laquelle on voit apparaître les symptômes nets de carence.

2° De discuter du problème de la sensibilité spécifique et variétale : notion de besoin en manganèse plus ou moins grand pour l'élaboration des substances organiques et en conséquence pour épier, pour produire du grain, relations racines-microbes (rhizosphère).

3° De montrer l'existence d'une période critique pour les céréales carencées, de préciser son origine, sa signification et ses conséquences agronomiques.

4° De montrer l'action de la fertilisation nitrique, qui se traduit par une augmentation de l'absorption du manganèse.

5° De préciser les caractéristiques analytiques de la plante carencée en manganèse : la teneur en matière sèche est abaissée et la teneur en cendres de la matière sèche nettement augmentée ; la teneur en manganèse est abaissée pendant la période critique et peut, à ce stade de végétation, servir de critère de la carence ; mais on constate un chevauchement des teneurs en manganèse des récoltes de céréales étudiées avec ou sans symptômes de carence, ce qui s'explique bien grâce aux études précédentes.

Du point de vue pratique, nous sommes arrivés très rapidement à la détection aisée des terres carencées, à l'établissement d'une technique efficace de guérison des plantes carencées et aussi à définir l'utilisation des amendements calcaires de manière à améliorer la productivité des terres humifères acides tout en évitant la carence en manganèse.

2. — La nutrition et la fertilisation azotée du blé d'hiver.

1° Recherches sur les besoins en azote du blé d'hiver :

Les besoins en azote dépendent essentiellement des facteurs agissant sur la physiologie du blé et est donc variable avec les conditions de milieu.

a) Examinant le *besoin global en azote* exprimé en fonction du rendement obtenu ou espéré, nous avons substitué au critère ancien fondé sur le contenu en azote d'un blé « bien réussi », un critère basé sur la teneur en azote idéale (teneur nécessaire et suffisante) des différentes parties du blé au moment du maximum d'absorption c'est-à-dire à la récolte. Ce besoin en azote global par quintal de grain récolté peut être facilement établi, grâce aux connaissances acquises, en fonction de la qualité recherchée du grain (teneur en matières azotées assez élevée) des variétés, du milieu.

b) *Le besoin en azote aux différents stades de développement du blé.* La courbe d'absorption de l'azote au cours de la végétation du blé ne peut nous renseigner sur les besoins réels aux différents stades car, en agriculture, nous avons montré qu'elle représente davantage les disponibilités en azote au cours de la végétation que les besoins. C'est l'expé-

rimentation rationnellement conçue qui permet d'améliorer nos connaissances sur ces besoins (variables en fonction du milieu).

Les recherches expérimentales nous ont conduit à définir quelques principes physiologiques devant guider la détermination des besoins au cours de la végétation.

Pour le blé d'hiver, lorsque les autres éléments nutritifs ont été amenés à l'optimum, on peut et on doit conduire, par la nutrition azotée, la croissance et le fonctionnement du blé de façon à obtenir le maximum de rendement et de qualité du grain pour un milieu donné.

Nous avons montré que lorsque la croissance de la partie végétative était terminée la plante avait néanmoins besoin d'azote ultérieurement pour un fonctionnement photosynthétique élevé. Autrement dit, il est nécessaire de réapprovisionner les feuilles et glumes en azote lors de la migration de matières azotées de ces organes vers le grain.

Nous considérons que le principe suivant est très important : un apport, à dose normale, d'azote absorbé et utilisé pendant la croissance active, provoque ultérieurement un besoin supplémentaire d'azote. Nous avons établi ce principe contraire en quelque sorte à la loi de Mitscherlich (loi des rendements moins que proportionnels), par des expériences en vases et au champ.

Ces principes nous permettent de comprendre le mode d'action de la nutrition azotée assurée aux différents stades de végétation sur les composantes du rendement : nombre d'épis à l'unité de surface, nombre moyen de grains par épi et poids moyen du grain, et ils nous permettent aussi de mieux saisir la nature de l'interdépendance de ces composantes.

c) *Besoins en azote pour l'obtention d'un grain de qualité* : La teneur en matière azotées du grain dépend de l'équilibre entre nutrition azotée (nutrition minérale) et nutrition carbonée (photosynthèse nette). La nutrition azotée tardive n'accroissant que relativement peu la nutrition carbonée, permet d'accroître assez fortement la teneur en azote du grain. Nous avons montré que cet accroissement se traduisait par une augmentation de la qualité meunière-boulangère du grain, en plus de la valeur nutritionnelle.

d) *Quelques conséquences agronomiques des faits et principes exposés* :

— *besoins en fonction de la variété* : les variétés productives devront avoir en général plus d'azote à leur disposition que les variétés moins productives pour arriver au maximum de rendement et de qualité du grain (principalement pendant la phase semi-tardive et tardive) ;

— le blé ne peut recevoir d'un bloc l'azote assimilable dont il a globalement besoin ; la fourniture d'azote doit être échelonnée...

2° FOURNITURE D'AZOTE PAR LE SOL :

Les études entreprises dans ce domaine nous ont conduit à la notion de systèmes culturaux en équilibre pour lesquels on peut faire apparaître

clairement le bilan de la fourniture d'azote aux plantes pendant un assolement : azote fourni = azote apporté ou restitué moins pertes par drainage.

L'importance des précédents culturaux a été succinctement examinée tant au point de vue fourniture globale d'azote que moment de cette fourniture.

3° Fertilisation azotée du blé d'hiver :

La fertilisation azotée doit compenser en quantité et au moment voulu la déficience par rapport aux besoins, de la fourniture d'azote provenant de la matière organique azotée du sol.

Les recherches précédentes ont permis d'entreprendre sur des bases nouvelles une expérimentation de fertilisation azotée dans divers milieux et en fonction de ces milieux. Elle a abouti à préconiser des techniques de fertilisations azotées qui, alliées à la possibilité de cultiver, dans ces conditions, des variétés de haute productivité, ont permis d'augmenter considérablement les rendements faibles ou moyens, et aussi, éventuellement, la qualité.

PRINCIPAUX TRAVAUX DE J. MOSSÉ

L'étude des systèmes protéine-sel-eau et des équilibres de phases de ces systèmes a conduit à tracer des diagrammes ternaires comparables aux diagrammes de phase (au début de 1950). On a ainsi pu montrer que la solubilité des protéines varie suivant une loi linéaire en fonction de la quantité d'électrolyte présent dans le système (et non pas de façon logarithmique) pour les concentrations supérieures à 1 p. 100.

Par une méthode s'inspirant du principe de la méthode des restes, on a démontré l'hydratation des protéines du sérum en solution et on en a donné une évaluation quantitative.

Au moyen des équilibres avec membrane semiperméable et des nouvelles données sur la solubilité signalées ci-dessus, on a, d'autre part, proposé une méthode de fractionnement des protéines valable d'une façon générale pour tout système polymère-solvant-non-solvant.

Dans le même esprit, ont été examinées les différentes méthodes d'extraction du virus de la mosaïque du tabac.

En vue d'élucider le mécanisme de la précipitation des protéines du sérum, celles-ci ont été étudiées en couches monomoléculaires étalées sur des solutions salines en traçant les isothermes de la pression superficielle et du potentiel de surface en fonction de l'aire moléculaire.

Du point de vue théorique, une mise au point a été faite sur les couches mixtes, c'est-à-dire les couches monomoléculaires obtenues par le mélange de deux substances, et une autre sur les phénomènes de la dialyse.

Enfin, le problème de l'hydratation des protéines a été repris par une nouvelle méthode : l'étude de la cinétique de la dessiccation de solutions aqueuses de protéines ; les résultats déjà établis par la méthode des restes ont ainsi été confirmés.

PRINCIPAUX TRAVAUX DE J. LAVOREL

L'observation originale de l'effet suivant a servi de point de départ pour un travail de thèse : l'activité catalasique de suspensions de chloroplastes est partiellement inhibée au cours de l'illumination ; elle est restaurée au niveau originel à l'obscurité. L'étude de la cinétique de cette photoinhibition a montré l'intervention d'une réaction photochimique d'inactivation et d'une réaction thermique monomoléculaire de réactivation. La réaction photochimique est sensibilisée par la chlorophylle (effet de la longueur d'onde) : elle fait intervenir quelques-uns au moins des intermédiaires du mécanisme photosynthétique (effet des inhibiteurs, de la chaleur, etc). La modification correspondante de la molécule de catalase est vraisemblablement la réduction du fer du groupe prosthétique. L'analogie de ce phénomène avec l'induction photosynthétique a conduit à postuler l'intervention d'une catalase modifiée photochimiquement dans le mécanisme de libération de l'oxygène au cours de la photosynthèse.

La notion de transfert d'énergie entre molécules identiques de colorants est à la base de la théorie de l'unité photosynthétique. Une étude théorique a permis de déterminer par observation de grandeurs macroscopiques (intensités de fluorescence à différentes longueurs d'onde, en fonction de la concentration), la longueur moyenne des chaînes de transferts dans les solutions fluorescentes. D'autre part, la chute anormale du rendement de fluorescence à droite de la dernière bande d'absorption a été interprétée quantitativement par un effet d'écran exercé par une forme dimère non fluorescente du colorant. L'anomalie correspondante du spectre d'action de la photosynthèse semble relever de la même explication.

PRINCIPAUX TRAVAUX DE J. BAUDET

Le premier travail effectué fut une étude sur les équilibres physicochimiques faisant intervenir des protéines et des nucléoprotéines : rôle de la caséine dans la stabilisation du lait en tant qu'émulsion, relation entre la taille des particules du virus de la mosaïque du tabac et la composition du milieu. Les techniques utilisées durent ensuite être mises à profit pour entreprendre une étude physiologique des acides nucléiques chez les végétaux. En effet, les difficultés spéciales dues à la complexité

des tissus et des cellules végétales ont nécessité la mise au point préalable d'une méthode d'extraction et de dosage des deux types d'acides nucléiques et d'une méthode de séparation des organites cellulaires par centrifugation différentielle après broyage des tissus.

On a pu constater que des organites aussi importants que les chloroplastes sont toujours très pauvres en acides nucléiques. Dans les tissus jeunes et en voie de croissance rapide (bourgeons, très jeunes feuilles), la majeure partie de l'acide ribonucléique se trouve dans les organites petits (« microsomes »). Dans les tissus adultes, c'est dans les organites de taille plus grande (mitochondries) que l'on rencontre le plus d'acide nucléique.

On a pu alors envisager l'influence de différents facteurs intervenant dans la physiologie de la plante : nutrition azotée, présence d'un virus... sur la répartition des acides nucléiques dans le végétal. Et cette évolution est maintenant suivie au cours de la germination et des premiers stades de développement du blé.

LABORATOIRE DES HORMONES (G. MOREL)

I. — Orientation du travail du Laboratoire.

La culture aseptique de tissus végétaux sur milieux nutritifs constitue un outil idéal pour le Physiologiste. Elle permet, avec beaucoup de facilité, de suivre le métabolisme végétal à l'échelle cellulaire sans aucun des inconvénients dus à l'hétérogénéité provenant de la différenciation que l'on rencontre lorsqu'on travaille sur des plantes entières ou des organes isolés. Les cellules toutes semblables se développent dans des conditions parfaitement déterminées sur un milieu chimiquement défini. On peut, avec la plus grande facilité, leur faire absorber n'importe quel métabolite et en suivre l'évolution.

Ce résultat a été long à obtenir et, au cours des premières années qui ont suivi sa fondation, une grande partie de l'activité du laboratoire a été consacrée à des mises au point de techniques, ceci dans le but de cultiver plus aisément les tissus végétaux ou d'obtenir la croissance de nouvelles espèces jusqu'alors réfractaires à ces traitements.

Une fois ces techniques suffisamment au point, elles ont été alors utilisées pour des travaux de Biochimie et l'activité du laboratoire s'est peu à peu orientée vers des points fondamentaux du métabolisme cellulaire : mode d'action des auxines, métabolisme des aminoacides, synthèse protéique.

Une autre partie de l'activité du laboratoire est consacrée aux déviations du métabolisme causées par les maladies des plantes. Les premières cultures de tissus réalisées étaient destinées à l'étude de parasites obli-

gatoires : Mildiou et Oïdium de la Vigne, Rouilles, etc. et, à cette époque, a été abordée l'étude des transformations que subit la cellule végétale sous l'effet de la bactérie du Crown-gall, au point de vue du métabolisme des auxines et plus récemment des acides aminés. Le Laboratoire avait aussi, à cette époque, étudié la multiplication de divers virus, comme celui de la Mosaïque du Tabac ou des virus X et Y de la Pomme de terre dans différents tissus cultivés *in vitro*, études qui ont été le point de départ de la méthode imaginée, avec C. MARTIN, pour guérir des plantes atteintes de maladies à virus par culture *in vitro* des méristèmes apicaux.

Depuis quatre ans, le laboratoire a étudié spécialement les déviations que cause au métabolisme de la plante l'inoculation d'un virus, changements profonds caractérisés par une augmentation de l'intensité des oxydases, par une accumulation importante de composés de nature phénolique, de composés fluorescents et des troubles dans la synthèse des anthocyanes, travaux qui ont permis la réalisation de tests biochimiques simples et précis pour le diagnostic des maladies à virus.

Parallèlement, au cours des recherches sur divers parasites qui causent, soit des hyperplasies (*Ustilago Exobasidium*), soit des nécroses (*Phytophtora*), a été entreprise l'extraction des toxines responsables de ces altérations cellulaires.

II. — Principaux résultats obtenus.

a) Technique de culture de tissus.

Les méthodes originales imaginées par GAUTHERET et ses collaborateurs n'ont permis la culture de tissus que d'un très petit nombre d'espèces végétales. Ces techniques faisaient appel aux parenchymes peu différenciés des organes charnus de certaines plantes ou au cambium des végétaux ligneux. Or beaucoup d'espèces ne possèdent ni cambium ni organes tubérisés. Pour mettre en culture les tissus de ces espèces, il a fallu partir de fragments indifférenciés isolés des méristèmes primaires ou encore de tissus embryonnaires. Il a été ainsi constaté dans beaucoup de cas (*Lupinus*, *Citrus*, etc.) que les tissus embryonnaires possèdent une faculté de prolifération beaucoup plus grande et des besoins nutritifs moindres que ceux de la plante âgée, propriétés qui les rapprochent des tissus tumoraux. L'étude du développement des gamétophytes des cryptogames vasculaires, fougères, lycopodes, sélaginelle, a permis de cultiver des tissus indifférenciés de ce groupe de plantes primitives.

Au cours de ces travaux sur les méristèmes apicaux, a été mise au point une technique qui permet d'obtenir le développement *in vitro* de ces organes. Nous avons pu ainsi régénérer des plantes normales à partir de fragments de moins de 100 μ ; c'est cette technique qui a été utilisée pour guérir des plantes atteintes de virus (avec M. MARTIN).

b) **Mode d'action de l'auxine.**

Ces travaux ont été réalisés avec des tissus de Topinambour qui se prêtent remarquablement à ce genre d'expériences.

Pendant la période de repos, les tissus du parenchyme vasculaire de la plante ne se développent pas dans des milieux sans auxine. Ils restent vivants pendant des mois sans changement apparent. Par contre, si l'on ajoute au milieu une auxine quelconque : acide indol acétique, naphtyl acétique, 2-4 dichlorophénoxyacétique, ils prolifèrent vigoureusement. Des dosages d'auxine réalisés par test d'avoine montrent que le tubercule au repos ne renferme aucune substance de croissance. Par contre, dès que ces tissus sont entrés en végétation sous l'effet de l'A. I. A., A. N. A. ou du 2.4.D, ils renferment une substance active sur le test avoine. Par chromatographie sur papier, on a pu montrer qu'en aucun cas on ne retrouve dans les tissus la substance de croissance incorporée au milieu, mais 2 corps nouveaux non identifiés. Ces corps sont toujours les mêmes, quelle que soit la substance utilisée pour stimuler.

Ceci semble indiquer que l'auxine n'est pas utilisée directement par la cellule, mais sert à déclencher certains processus métaboliques par lesquels la cellule fait la synthèse des substances de croissance qui lui sont propres.

c) **Métabolisme des acides aminés (avec M. DURANTON)**

Les déterminations ont été faites par la technique de chromatographie sur colonne de résine de MOORE et STEIN, méthode extrêmement élégante et précise. Le matériel utilisé a été le tubercule de Topinambour.

Pendant la période de repos, le tubercule accumule une grande quantité d'Arginine : 0,3 p. 100 du poids frais, soit 70 à 80 p. 100 des produits azotés solubles. Dans les tissus mis en culture sur un milieu dépourvu d'auxine, aucune évolution azotée ne se produit. Par contre, en présence d'acide indolacétique à 10^{-7}, en 6 jours, l'arginine disparait entièrement en même temps qu'apparaissent de la proline et de l'hydroxyproline et qu'augmente l'acide glutamique et l'acide aspartique. A l'aide d'arginine marquée au C^{14}, on peut suivre les transformations de la molécule, transformations analogues à celles qui se produisent chez certains microorganismes :

Arginine → Ornithine → Semialdéhyde glutamique → Ac. pyroline carboxilique →
+ Urée
Proline → Hydroxypoline

ces deux derniers acides aminés étant incorporés dans les protéines ; c'est la première fois que l'hydroxyproline a été caracterisée à l'état libre chez les végétaux supérieurs.

Des expériences analogues, réalisées avec des tissus tumoraux de la même plante, semblent par contre indiquer un métabolisme très diffé-

rent. L'arginine libre ne disparaît jamais entièrement et, au cours de la dégradation, il se forme au moins 7 guanidines substituées, parmi lesquelles l'acide γ guanido-butyrique et α hydroxy 6-guanido valérique, ce qui semble indiquer un équipement enzymatique entièrement différent de ces deux types de tissu.

d) **Diviations du métabolisme (avec C. MARTIN)**

M. MARTIN a découvert que le jus exprimé de Pommes de terre atteintes de virus X ou Y possède la propriété extraordinaire de recolorer instantanément certains colorants réduits, comme le 2.6.dichlorophénol indophénol alors que le jus de témoins sains les laisse incolores.

L'étude des oxydases des tissus de plantes saines et malades a permis de découvrir qu'il s'accumule chez ces derniers un certain nombre de composés qui constituent des substrats pour la polyphénoloxydase, de sorte que la recoloration du Bleu d'indophénol s'explique de la manière suivante :

$$\begin{array}{ccc} O_2 & \text{Phénol} & \text{2. 6. dichlorophénol indophénol oxydé bleu} \\ \downarrow & \downarrow \quad \uparrow & \uparrow \\ H_2O & \text{Quinone} & \text{2. 6. dichlorophénol indophénol réduit incolore} \end{array}$$

Il s'agit d'une réaction d'oxydation couplée.

Cette propriété est commune à beaucoup de maladies à virus. En dehors des virus X et Y de la Pomme de terre, la mosaïque du Tabac, du Concombre, du Dahlia, la présente également. Ces phénols s'accumulent très rapidement après l'inoculation du virus (36 h chez le Tabac avec M. T.) c'est-à-dire bien avant l'apparition des symptômes de la maladie. Cette réaction constitue un test rapide et précis pour la détection des virus de la Pomme de terre et du Dahlia. Certains de ces phénols ont pu être isolés des plantes malades sous forme cristallisée et caractérisés avec certitude. Ce sont, chez le Tabac, l'acide chlorogénique, isochlorogénique et la Rutine.

Peu après l'inoculation de la mosaïque du Tabac on voit également apparaître dans toute la plante une substance fluorescente qui a été caractérisée avec certitude comme le monoglucoside de la scopolétine.

Enfin chez les germes de Pomme de terre, en même temps que la formation de ces composés, on constate une inhibition de la synthèse des anthocyanes. Cette inhibition permet, elle aussi, un diagnostic facile des virus.

e) **Mode d'action d'organismes pathogènes.**

Nos travaux ont surtout porté sur les toxines du Mildiou de la Pomme de terre. Nous utilisons comme test le diamètre des nécroses produites sur une feuille de Tabac pour isoler la toxine responsable des symptômes de la maladie.

LABORATOIRE DES ENZYMES (G. DUCET)

Orientation des Travaux.

Notre travail de thèse nous ayant indiqué l'intérêt d'étudier le métabolisme par la voie des actions enzymatiques, nous avons, en collaboration avec A. J. ROSENBERG, commencé l'étude des enzymes de la chaîne respiratoire des organes chlorophylliens.

Nous avons montré la présence de cytochrome-oxydase dans les particules cellulaires isolées des feuilles vertes, même dans celles contenant des polyphénol-oxydases très actives. Pour mettre cet enzyme en évidence, il est parfois nécessaire d'inhiber complètement les tyrosinases, par exemple dans la feuille de poirier. Etudiant plus complètement la chaîne respiratoire nous avons également montré la présence, dans les tissus chlorophylliens, de réductases qui transportent l'hydrogène des pyridines nucléotides sur le cytochrome C. Il y a donc analogie entre les chaînes respiratoires des tissus végétaux et animaux.

L'oxyde de carbone est un inhibiteur spécifique de la cytochrome-oxydase. Nos études ont montré que l'oxyde de carbone inhibe la respiration des jeunes feuilles et exalte celle des feuilles mûres ou âgées. De plus, ce gaz induit une glycolyse aérobie, caractérisée par une production d'alcool et de gaz carbonique correspondant à la disparition stoéchiométrique de l'amidon. Cette glycose a une grandeur variable, fonction des conditions d'alimentation carbonée de la plante. Le maximum d'action de l'oxyde de carbone correspond à un rapport $\frac{CO}{O_2}$ d'environ 50, ce qui indique une très forte affinité de l'enzyme pour l'oxygène.

Le métabolisme du phosphore est troublé sous l'influence du CO. Ce gaz, en fait, agit comme le dinitrophénol (en particulier sur la synthèse des liaisons phosphoriques). Alors que le mode d'action du dinitrophénol est inconnu, par contre on sait que l'oxyde de carbone se combine sélectivement à des composés hématiniques. Le « couplage » entre oxydation et phosphorylation doit donc être lié à de tels composés. Les études se poursuivent dans cette direction.

La chaîne respiratoire des végétaux et des animaux est supportée par des particules cellulaires, principalement les mitochondries. En étudiant la liaison entre phosphorylation et oxydation par les mitochondries de pois on a montré, en utilisant le phosphore marqué, l'influence des conditions de préparation (toxicité du milieu, co-facteurs) sur l'intensité des phosphorylations et des déphosphorylations.

Ces études ont nécessité la mise au point de méthodes diverses : minéralisation et dosage colorimétrique rapide, fractionnement et dosage de composés phosphorés, ainsi que, récemment, une méthode sensible de dosage chimique et radiométrique du phosphore.

Ces études fondamentales sont poursuivies dans le cadre de recherches sur le rôle des microéléments dans la vie de la plante.

Après avoir étudié à Long Ashton les techniques de culture en milieu artificiel, nous avons commencé à Versailles des travaux portant d'une part sur l'influence du bore dans le métabolisme des arbres fruitiers et, d'autre part, sur l'importance du cuivre dans la synthèse des enzymes respiratoires. Le but de ces recherches est la mise au point de méthodes physiologiques de détection des carences par l'étude des troubles métaboliques. L'utilisation des éléments marqués, en particulier P^{32} et C^{14} a permis d'obtenir des résultats touchant la synthèse des glucides dans les cas de carence en bore.

En outre, un problème concernant la teneur en solanine de certaines variétés de pomme de terre commercialisée, nous a été posé. Après la mise au point d'une méthode d'analyse rapide, les premiers résultats semblent indiquer une influence des conditions climatiques sur la teneur en solanine de la variété Rosevale.

LABORATOIRE DES DÉSHERBANTS (R. LONGCHAMP)

I. — Désherbage des blés, orge, avoines.

En 1949, l'emploi des hormones de synthèse (2. 4 D et MCPA) comme herbicides était en pleine expansion, mais les modalités d'emploi étaient encore incertaines.

Une enquête faite à notre demande par l'Association Générale des Producteurs de Blé révéla que 20 p. 100 des utilisateurs du 2. 4. D avaient subi des mécomptes plus ou moins graves. Devant l'importance du problème, un programme d'expérimentation très étendu (plus de 40 champs d'essais) fut mis en œuvre avec la collaboration du Pr GAUTHERET, de la Faculté des Sciences de Paris.

De cet ensemble d'essais se sont dégagés des conclusions aujourd'hui largement vulgarisées.

Le stade de développement de la céréale constitue le facteur le plus important. Les accidents varient en nature suivant l'époque du traitement. Lorsque celui-ci est effectué pendant le tallage, il provoque des déformations très spectaculaires : enroulements de feuilles, torsions de tiges, ramifications d'épis, soudure de glumes, etc. Malgré leur gravité apparente, ces déformations n'ont que peu de conséquences pour le rendement et les grains récoltés sur les plantes accidentées germent et redonnent des plantes normales.

Par contre, les traitements effectués au stade du « gonflement » provoquent des stérilités plus ou moins marquées qui ont pour effet de diminuer le rendement.

Les variétés font preuve, vis-à-vis des hormones désherbantes, d'une

sensibilité très variable. Les variétés cultivées en France ont été étudiées à cet égard et les traitements aux hormones sont à déconseiller sur certaines d'entre elles trop sensibles (Blé Fylgia, Orge Aurore, Avoine Noire de Moyencourt, etc.).

Enfin certaines formes de 2. 4. D possèdent vis-à-vis des Céréales des propriétés de toxicité telles que leur emploi doit être sinon déconseillé, du moins accompagné de grandes précautions. C'est le cas des esters légers ou lourds du 2. 4. D.

Les poudres à base d'hormones herbicides ont également été déconseillées à cause de la variabilité des résultats et des dangers d'accidents sur cultures sensibles, les produits en poudre pouvant être entraînés très loin par le vent.

Ce travail se poursuit régulièrement avec la collaboration de l'A. G. P. B. par des essais de sensibilité variétale qui permettent chaque année de tester les variétés nouvelles et de conseiller ou non leur traitement au 2. 4. D.

De nombreux essais de rendement ont permis de préciser le bénéfice ou la perte que l'on pouvait attendre de l'application des désherbants chimiques aux céréales. Ce travail a conduit à redonner aux colorants nitrés une partie de l'importance qu'ils avaient perdue lors de la généralisation des traitements aux hormones, les augmentations de rendement étant souvent plus marquées avec les colorants nitrés, à cause de leur application plus précoce sur les mauvaises herbes plus jeunes, et aussi d'une moindre toxicité sur les Céréales.

Il est possible de lutter avec efficacité contre une mauvaise herbe du littoral breton, le Chrysanthème des Moissons, en utilisant le dinitrobutylphénol.

II. — Désherbage du maïs.

L'extension considérable de la culture du Maïs en France (500.000 ha en 1956) a conduit à étudier les conditions du désherbage de cette plante.

Commencés en 1953 avec la collaboration de l'A. G. P. M. et de l'A. G. P. B., les essais se poursuivent. Ils ont permis plusieurs conclusions pratiques :

1° Le produit le moins toxique pour le Maïs est le sel d'amine du 2. 4. D.

2° Le traitement peut être effectué dès que le Maïs a 5 cm, mais à condition, évidemment, que les mauvaises herbes soient levées. Les traitements doivent cesser dès que les racines superficielles commencent à se former, c'est-à-dire lorsque le Maïs a 20 à 25 cm.

3° Il existe des différences de sensibilité très nettes entre les variétés, les plus précoces étant en général les plus sensibles.

Les essais de rendement ont montré que le Maïs était très affecté par la présence de mauvaises herbes. Les chutes de rendement dans les parcelles non désherbées peuvent atteindre 50 p. 100.

La culture du Maïs dans le Sud-Ouest pose des problèmes spéciaux de désherbage qui ne sont pas résolus par l'emploi des hormones, les adventices à détruire comprenant surtout des graminées (Panics, Sétaires, Digitaires), insensibles à ces produits.

III. — Désherbage du riz.

L'envahissement rapide des rizières par les mauvaises herbes a aussi entraîné une série d'essais. La variété Ballila, la plus répandue, possède une grande résistance aux hormones ; elle ne présente qu'exceptionnellement des déformations et des stérilités dues à leur action directe. Néanmoins, l'emploi du 2. 4. D. n'est pas sans danger sous le climat camarguais. L'étude des accidents nombreux qui se sont produits en 1954 et des essais entrepris en 1955 et 1956, a permis de tirer quelques conclusions importantes :

1° Les dérivés du MCPA sont moins dangereux pour le Riz que les dérivés du 2. 4. D, dont les esters lourds se montrent plus particulièrement toxiques.

2° Les accidents observés sont toujours dus à une fécondation imparfaite provoquée par le retard qu'introduisent les hormones dans le cycle de végétation du Riz.

3° La destruction des Panicum, mauvaises herbes les plus dangereuses en rizière, est possible grâce à l'emploi de l'acide trichloracétique (T. C. A.), mais le mode d'emploi de ce produit est délicat et il n'est efficace que lorsque la température est suffisamment élevée pour permettre une germination précoce des Panicum avant le semis du Riz. Cette solution n'est pas définitive.

Une nouvelle forme du 2. 4. D, le 2. 4. dichlorophénoxyéthanol employé sous forme de granulé, a donné des résultats encourageants.

IV. — Recherches sur l'Hydrazide maléique.

Les propriétés de cet inhibiteur puissant justifiaient l'étude de ses possibilités d'emploi en agriculture. Les résultats sont en général décevants.

La plus intéressante application de l'H. M. consiste dans l'inhibition de la germination des pommes de terre destinées à être consommées. Il permet de conserver des pommes de terre pendant près d'une année, mais n'a pu être conseillé en pratique, des doutes subsistant sur la possibilité d'une action cancérigène de ce produit que l'on retrouve dans les tubercules des plantes traitées.

Son emploi comme inhibiteur des repousses du Tabac après écimage a été abandonné, l'Institut des Tabacs de Bergerac ayant observé qu'une accumulation anormale d'amidon dans les feuilles traitées gênait la fermentation.

De grands espoirs avaient été fondés sur l'utilisation de l'hydrazide maléique pour la conservation des betteraves sucrières. Malheureusement, si nous avons obtenu des augmentations de rendement en sucre atteignant 10 p. 100 et des diminutions de perte pendant le stockage atteignant 50 p. 100, ces actions ne se sont pas montrées renouvelables dans le temps. L'efficacité de l'hydrazide maléique sur la betterave dépend de conditions physiologiques impossibles à préciser actuellement.

La variabilité des résultats obtenus avec l'H. M. dans la lutte contre le Chiendent nous a conduits également à abandonner ce produit comme désherbant.

ACTIVITÉS ET RÉALISATIONS AUTRES QUE DE RECHERCHE

Le personnel de la Station a manifesté des activités dans le domaine de l'Enseignement (cours à l'École d'Horticulture de 1950 à 1953, et à l'Université de Harvard (U. S. A.) en 1952) ; de la Vulgarisation (lors de réunions de Directeurs et Ingénieurs des Services Agricoles, d'organismes agricoles spécialisés (Fédération Nationale de la Pomme de terre de Semence), de Centres d'Études Techniques Agricoles, etc.). Il a pu assister à de nombreux Congrès Internationaux (Congrès de Botanique, de Chimie-Biologie, de Chimie pure et appliquée, des Industries Agricoles, etc.) où ils ont représenté très honorablement leur pays en exposant les résultats de leurs travaux, en faisant des conférences demandées, etc. Ils ont participé à la création et au développement de la Société de Physiologie Végétale.

Nos laboratoires, et plus particulièrement celui de cultures de tissus, ont accueilli un nombre relativement grand de Stagiaires étrangers (Grande-Bretagne, Etats-Unis, Allemagne, Grèce, Brésil, Liban...) et français.

Nos relations avec les chercheurs étrangers sont très développées et nous avons souvent leur visite lors de leur venue en France.

En conclusion, nous pouvons affirmer que, depuis la création du Laboratoire de Physiologie Végétale, en 1950, jusqu'à 1956, la discipline « Physiologie Végétale » s'est affirmée, tant par les réalisations ayant amélioré la technique agricole que par les fondements scientifiques solides sur lesquels elle a voulu s'appuyer. Pour mieux servir l'Agriculture dans notre discipline, il faut associer des connaissances solides de Physiologie Végétale au goût de la Recherche et à l'utilisation des techniques modernes permettant de pénétrer toujours plus avant dans le mécanisme intime des phénomènes ; puis avoir le désir constant et l'ambition tenace de participer au progrès de l'Agriculture.

LISTE DES PUBLICATIONS DE LA STATION CENTRALE DE PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE

Année 1950.

COÏC (Y.), COPPENET (M.) et DE BAISSÉ (Mlle G.). — Évolution du manganèse dans le tubercule de semence de pomme de terre au cours de la disparition des réserves. *C. R. Acad. Sci.*, **230** p. 1207-1209.

COÏC (Y.), COPPENET (M.) et VOIX (Mlle S.). — Action de l'azote sur l'absorption du manganèse par l'avoine. *C. R. Acad. Sci.*, **230**, p. 1610-1611.

MOREL (G.). — Sur la culture de tissus de deux monocotylédonnes. *C. R. Acad. Sci.*, **230**, p. 1099-1101.

MOREL (G.). — Sur la culture de tissus d'*Osmunda Cinnamomea*. *C. R. Acad. Sci.*, **230**, p. 2318-2320.

LONGCHAMP (R.) et PACHECO (H.). — Action du 2 4. Dibromephénylglycolle sur le développement des tissus de topinambour cultivés *in vitro*. *C. R. Acad. Sci.*, **231**, pp. 1535-1537.

COÏC (Y.). — Contribution à l'étude de la physiologie du blé : la nutrition azotée du blé. *Ann. Agron.*, p. 195-203.

COÏC (Y.), COPPENET (M.) et HELIAS (M.). — Influence de l'époque d'apport des engrais azotés sur les composantes du rendement en blé. *C. R. Acad. Agric.*, **37**, p. 231-234.

COÏC (Y.). — Fertilisation azotée rationnelle du blé. *C. R. Acad. Agric.*, p. 296-299.

BRAUN (A. C.) and MOREL (Georges). — A comparison of normal habituated and crown-gall tummer tissue implants in the European grape. *Am. J. of Botan.*, **37**, p. 499-501.

Année 1951.

COÏC (Y.) et DE BAISSÉ (Mlle). — Évolution du manganèse dans les différents organes de la pomme de terre. *C. R. Acad. Sci.*, **232**, p. 1577-1579.

DUCET (G.) et ROSENBERG (A. J.). — Activité respiratoire chez les végétaux supérieurs : III. — Liaison entre les phosphopyridines nucléotides et le cytochrome oxydase. IV. — Dégagement de CO_2 par les feuilles vertes en atmosphère d'azote et d'oxyde de carbone. *C. R. Acad. Sci.*, **233**, p. 1136-1137. V. — Présence de cytochromes C réductases dans les feuilles vertes. *C. R. Acad. Sci.*, **233**, p. 1674-1676.

LONGCHAMP (R.), ROY (M.) et GAUTHERET (R. J.). — Action de l'éther éthylique du 2.4.D sur le développement de *Claviceps purpurea* dans les champs de blé. *C. R. Acad. Sci.*, **233**, p. 888-890.

LONGCHAMP (R.), ROY (M.) et GAUTHERET (R. J.). — Recherches sur l'action comparée de quelques désherbants sélectifs sur les Céréales. *C. R. Acad. Sci.*, **232**, p. 111-113.

LONGCHAMP (R.), ROY (M.) et GAUTHERET (R. J.). — Sur la stérilisation du Blé par les hétéro-auxines désherbantes. *C. R. Acad. Sci.*, **234**, p. 558-560.

NITSCH (J. P.). — Action du jus de Tomate sur la croissance des tissus de crown-gall cultivés *in vitro*. *C. R. Acad. Sci.*, **233**, p. 1676-1677.

WETMORE (R. H.) et MOREL (G.). — Sur la culture *in vitro* de prothalles de *Lycopodium cernuum*. *C. R. Acad. Sci.*, **233**, p. 323-324.

WETMORE (R. H.) et MOREL (G.). — Sur la culture du gamétophyte de Sélaginelle. *C. R. Acad. Sci.*, **233**, p. 430-431.

COÏC (Y.), DE BAISSÉ (M[lle] G.) et COPPENET (M.). — Evolution du Manganèse dans les différents organes de la Pomme de terre. *Ann. Agron.*, p. 31-46.

DUCET (G.), BATS (J.) et DUPOUY-BRAS (M[me]). — Méthode de dosage colorimétrique. *Ann. Agron.*, p. 368-381.

LONGCHAMP (R.), ROY (M.) et GAUTHERET (R. J.). — Recherches sur l'action du 2.4.D. et du M. C. P. A. sur la vigne. *Ann. Agron.*, p. 849-856.

COÏC (Y.) et COPPENET (M.). — Carence en Manganèse de l'Orge. *C. R. Acad. Agric.*, **37**, p. 103-105.

COÏC (Y.) et COPPENET (M.). — Expérience sur la carence en Manganèse de l'Avoine. *C. R. Acad. Agric.*, **37**, p. 106-107.

COÏC (Y.) et COPPENET (M.). — Manganèse et Croissance du Blé. *C. R. Acad. Agric.*, **37**, p. 157-159.

COÏC (Y.) et DE BAISSÉ (M[lle] G.). — Manganèse et filosité de la Pomme de terre. *C. R. Acad. Agric.*, **37**, p. 278-279.

DUCET (G.) et ROSENBERG (A. J.). — Activité respiratoire chez les végétaux supérieurs. II. Activité cytochrome oxydasique et polyphénoloxydasique chez quelques végétaux supérieurs. *Bull. Soc. Chimie Biol.*, **33**, p. 321-336.

NITSCH (J. P.). — Le micro-dosage du L. tryptophane dans les plantes. *C. R. Soc. Biologie*, **145**, p. 1809-1812.

MOREL (G.) and WETMORE (R. H.). — Tissue culture of Monocotyledons. *Am. Journ. of Botany*, **38**, p. 138-140.

MOREL (G.) and WETMORE (R. H.). — Fern callus tissue culture. *Am. Journ. of Botany*, **38**, p. 141-143.

NITSCH (J. P.). — Growth and development *in vitro* of excised ovaries. *Am. Journ. of Botany*, **38**, p. 566-577.

NITSCH (J. P.) and WETMORE (R. H.). — The microdetermination of « free » L. tryptophane in the seedling of *Lupinus albus*. *Science*, **116**, p. 256-257.

Année 1952.

DUCET (G.) et ROSENBERG (A. J.). — Activités respiratoires des végétaux supérieurs : VI. Action de l'oxyde de carbone sur la respiration des feuilles vertes. *C. R. Acad. Sci.*, **234**, p. 549.

LONGCHAMP (R.), ROY (M.) et GAUTHERET (R. J.). — Sur la stérilisation du Blé par les hétéro-auxines désherbantes. *C. R. Acad. Sci.*, **234**, p. 558-560.

MOREL (G.) et MARTIN (C.). — Guérison de Dahlias atteints d'une maladie à virus. *C. R. Acad. Sci.*, **235**, p. 1324-1325.

VINDARD (G.), DASTE (PH.) et LONGCHAMP (R.). — Action comparée du 2-méthyl 4-chlorophénoxyacétate de sodium (MCPA) sur le développement de l'Azobacter dans divers sols. *C. R. Acad. Sci.*, **235**, p. 1048-1049.

COÏC (Y.). — La Nutrition azotée du Blé. *Ann. Agron.*, p. 417-421.

BAUDET (J.), LESAINT (M.) et COÏC (Y.). — Dosage des acides nucléiques dans certaines fractions cellulaires de feuilles. *Ann. Agron.*, p. 476-480.

LONGCHAMP (R.), ROY (M.) et GAUTHERET (R. J.). — Nouvelles recherches sur l'action de quelques hétéro-auxines désherbantes sur les Céréales. *Ann. Agron., I. N. R. A.*, Série B, p. 117-174.

LONGCHAMP (R.), ROY (M.) et GAUTHERET (R. J.). — Action de quelques hétéro-auxines sur la morphogenèse des Céréales. *Ann. I. N. R. A.*, Série B, p. 305-327.

COÏC (Y.), COPPENET (M.) et MAUVISSEAU (M[lle] M. J.). — Différence de sensibilité à la carence en Manganèse de variétés d'Avoine. *C. R. Acad. Agric.*, p. 209-212.

LONGCHAMP (R.), ROY (M.) et GAUTHERET (R. J.). — Action des diverses hétéro-auxines désherbantes sur le rendement des Céréales. *C. R. Acad. Agric.*, p. 81.

LONGCHAMP (R.), ROY (M.) et GAUTHERET (R. J.). — Sur les variations de la sensibilité des Blés d'hiver à l'égard des hétéro-auxines désherbantes au cours des diverses phases de leur évolution. *C. R. Acad. Agric.*, **38**, p. 74-80.

Année 1953.

COÏC (Y.) et JOLIVET (E.). — La Fertilisation azotée semi-tardive et tardive du Blé d'hiver : I. Action sur le rendement. *C. R. Acad. Agric.*, p. 741-744.

COÏC (Y.) et ALEXINSKI (W.). — La Fertilisation azotée semi-tardive et tardive du Blé d'hiver : II. Action sur le taux d'azote du grain et sa qualité meunière-boulangère. *C. R. Acad. Agric.*, p. 782-788.

DUCET (G.) et ROSENBERG (A. J.). — Activités respiratoires chez les végétaux supérieurs : VII. Glycolyse aérobie provoquée par l'oxyde de carbone. *Bull. Soc. Chimie Biol.*, **35**, p. 467-476.

DERVICHIAN (D. G.) et MOSSÉ (J.). — Equilibre de phase dans les systèmes protéine-sel-eau. Conséquences relatives à la solubilité des protéines. *Bull. Soc. Chimie Biol.*, **35**, p. 1267-1308 (Institut Pasteur, Laboratoire de M. DERVICHIAN).

DEMETRIADES (S.). — Action du Bleu d'aniline et du Rouge de chlorophénol sur la formation et la croissance des tissus de crown-gall. *C. R. Soc. de Biologie*, **147**, p. 280-282.

DEMETRIADES (S.). — Sur l'action cancérigène de l'endotoxine de l'*Agrobacterium tumefaciens*. *C. R. Soc. de Biologie*, **147**, p. 282-283.

MOREL (G.) and STEEVES (T. A.). — A technique for preventing inactivation at the cut surface in Auxin diffusion studies. *Am. Journ. of Botany*, **40**.

Année 1954.

JOLIVET (E.) et COÏC (Y.). — Sur une carence potassique du Pommier accentuée par une forte mise à fruits : partage des cations nutritifs et principalement K et Mg entre la feuille et le fruit. *C. R. Acad. Sci.*, **238**, p. 2251-2253.

SCHOEN (U.) et MOREL (G.). — Elaboration de substances de croissance par les tissus de Topinambour cultivés *in vitro*. *C. R. Acad. Sci.*, **238**, p. 2549-2550.

LAVOREL (J.). — Influence de la lumière sur l'activité catalasique des suspensions de chloroplastes. *C. R. Acad. Sci.*, **238**, p. 1075-1076 (Laboratoire de Biologie Physico-Chimique : M. WURMSER).

LAVOREL (J.). — Quelques caractéristiques cinétiques de l'action de la lumière sur la catalase des chloroplastes. *C. R. Acad. Sci.*, **239**, p. 1706-1708 (Laboratoire de Biologie Physico-Chimique, M. WURMSER).

DUCET (G.), COPPENET (M.), CALVEZ (Mme J.) et BATS (J.). — Microdosage du Cu dans les végétaux par le 2-2'Diquinoléine. *Ann. Agron.*, p. 597-600.

COÏC (Y.). — Action de la fertilisation azotée utilisée pour la croissance sur les besoins ultérieurs du Blé en Azote. Conséquences Agronomiques. *C. R. Acad. Agric.*, p. 100-102.

COÏC (Y.). — Que pouvons-nous espérer de la fertilisation azotée semi-tardive et tardive du Blé d'hiver ? *C. R. Acad. Agric.*, p. 214-218.

ALEXINSKY (W.) et COÏC (Y.). — Action des fertilisations azotées semi-tardive et tardive des Blés d'hiver sur la qualité boulangère. *C. R. Acad. Agric.*, p. 656-660.

Année 1955.

LAVOREL (J.). — « Photo-inhibition de la catalase des chloroplastes ». Thèse de Doctorat ès Sciences, Paris.

MOREL (G.) et MARTIN (C.). — Guérison de Pommes de terre atteintes de maladie à virus. *C. R. Acad. Agri.*, **41**, p. 472-475.

MOREL (G.) et GAUTHERET (R. J.). — Recherches sur les phénomènes d'histogenèse provoqués par l'acide naphtalène acétique et le lait de coco dans les cultures de tissus d'*Amorphophalus rivieri. Revue Gén. de Botanique*, **42**, p. 437.

MOREL (G.), et STEEVES (T. A.) and SUSSEX (I. M.). — Enzymatic auxin inactivation by retracts of the Fern *Osmunda Cinnamomea. Plant Physiology*, **30**, p. 143-148.

LONGCHAMP (R.) et GAUTHERET (R. J.). — Recherches sur l'inhibition du développement de l'Osier par l'Hydrazide maléique et l'acide naphtalène acétique. *Revue Gén. de Botanique*, **62**, p. 689.

Année 1956.

COÏC (Y.) et VANDEWALLE (Mlle G.). — Entrée dans le tubercule de Pomme de terre, pendant le premier développement, de PO_4 provenant du milieu extérieur. *C. R. Ac. Sci.*, **242**, p. 810-812.

COÏC (Y.) et VANDEWALLE (Mlle G.). — Variation des forces de rétention ou d'absorption de PO_4 par la Pomme de terre pendant son développement. Conséquences agronomiques. *C. R. Ac. Sci.*, **242**, p. 1763-1765.

COÏC (Y.). — La Nutrition et la Fertilisation Azotée du Blé d'Hiver. I. Les besoins en azote du Blé d'hiver. Conséquences agronomiques. *Ann. Agron.*, n° 1, p. 115-129.

LONGCHAMP (R.), RICHEZ (M.) et GAUTHERET (R. J.). — Action de dérivé de l'Hydrazide maléique sur le développement et la teneur en sucre de quelques végétaux. *Revue Gén. de Botanique*, **63**, p. 22.

MOSSÉ (J.). — Etude sur les systèmes protéine-sel-eau : hydratation des protéines, solubilité, relargage, fractionnement. Thèse de Doctorat ès-Sciences, Paris.

MOREL (G.). — Nouvelles méthodes permettant de réaliser des cultures de tissus végétaux. *Rev. Gén. Botan.*, **63**, p. 314-324.

MOREL (G.). — Prolifération des feuilles d'Adiantum pedatum cultivées *in vitro. Rev. Gén. Botan.*, **63**, p. 329-330.

BARBIER (G.) et COÏC (Y.). — Sur la fumure azotée de la Betterave Sucrière. Publications Institut Technique de la Betterave (Travaux effectués par les Stations de Recherches de l'INRA).

ÉVOLUTION DES CONSTITUANTS PHOSPHORÉS DU GRAIN DE BLÉ AU COURS DE LA MATURATION — ACIDES NUCLÉIQUES ET SYNTHÈSE PROTÉIQUE

PAR

A. BOURDET et J. HÉRARD

Laboratoire de Biochimie et Physico-Chimie des céréales.
Laboratoire d'études et de contrôle de la qualité des blés français.

PLAN DU MÉMOIRE

INTRODUCTION

La composition phosphorée du grain de blé est caractérisée, comme celle des autres céréales, par une proportion élevée de phosphore phytique. Des nombreuses déterminations effectuées, dont les résultats essentiels ont été rassemblés dans le tableau I ci-dessous, il ressort que le phosphore phytique constitue en moyenne à lui seul entre les 2/3 et les 3/4 du phosphore total du grain mûr.

TABLEAU I

Composition en phosphore phytique des grains de diverses variétés de blé.

Blé	Phosphore phytique		Auteurs
	mg p. 100 g	p. 100 du P total	
Italien	609	70,8	Masoni (1915).
Américain	303	71	Webster (1928).
Polonais	—	79	Wiazownicka (1933).
Français	—	76	Feyte (1933).
Syrien	—	77,5	
Blés durs	—	62,5	
Italien	266	70,8	Quagliariello ([illegible]).
Américain	152 à 328	56,7 à 94,3	Young et Greaves (1940).
Manitoba	238	72	Pringle et Moran (1942).
Plate	316	76	
Anglais	285	73	
Manitoba	242	69	McCance et Coll. (1945).
Anglais	233 à 255	68 à 73	
Australien	172	67,1	Lee et Underwood (1948).
Manitoba	260 à 290	63 à 66	Bigwood (1951).
Belge	270	87	

Comme l'indiquent les chiffres précédents, la teneur du grain en phosphore phytique, de même que sa proportion par rapport au phosphore total, peuvent subir de très importantes variations selon les variétés. Les proportions de P phytique déterminées par FEYTE (1933) sur divers échantillons de blés tendres français et syriens et de blés durs s'échelonnent entre 54 et 90 p. 100 du P total, la moyenne s'établissant autour de 73 p. 100

Si les variations observées par COMMON (1940) sont moindres (de 66 à 77 p. 100 du P total), celles constatées par YOUNG et GREAVES (1940) sur 21 échantillons de blé sont voisines de celles signalées par FEYTE et également très importantes ; certaines variétés sont en effet deux fois plus riches en phosphore phytique que d'autres, la teneur du grain étant comprise entre les valeurs extrêmes de 152 à 328 mg 100 g et les proportions par rapport au phosphore total allant de 56,7 à 94,3 p. 100.

Les résultats de FEYTE sembleraient indiquer que le phosphore phytique se trouve en proportions plus élevées dans les blés tendres (moyenne 76 p. 100) que dans les blés durs (moyenne 62 p. 100). Et cependant, les observations ultérieures de COURTOIS et PEREZ (1948), sur 9 variétés de blé tunisiens, ont montré que les blés tendres apparaissent moins riches en phosphore phytique (145 à 177 mg p. 100 g) que les blés durs (183 à 200 mg p. 100 g). Dans un même ordre d'idées, HAYS (1942) a signalé que la teneur en phosphore phytique de certains blés blancs est plus faible que celle de blés roux.

On sait d'autre part que l'acide phytique est réparti de façon irrégulière dans le grain : peu abondant dans l'endosperme, il est localisé

principalement dans les cellules à aleurone et l'embryon. D'après ANDREWS et BAILEY (1932) le rapport P phytique/P total serait de 86 p. 100 dans le son et de 48 p. 100 dans le germe, témoignant indirectement que ce dernier est plus riche en phosphore lipidique et nucléique que le son. HINTON (1944) a d'ailleurs précisé que la concentration en acide phytique est 3 fois plus élevée dans le scutellum que dans le germe, les rapports P phytique/P total étant respectivement de 0,72 et 0,32. Cette répartition histologique explique que la teneur d'une farine en phosphore phytique est d'autant plus élevée que son taux d'extraction est lui-même plus haut, sans d'ailleurs qu'il y ait proportionnalité entre ces deux caractéristiques ainsi que l'a souligné GUILLEMET (1946).

Les constituants phosphorés autres que l'acide phytique représentent donc approximativement le 1/4 ou le 1/3 du phosphore total du grain. A côté d'une certaine proportion de phosphore minéral, diversement estimée selon les auteurs et que l'on pense être constituée en partie de phosphate monopotassique, il s'agit de formes phosphorées organiques de nature lipidique et nucléique. Le grain de blé contient également une très faible proportion de phosphore organique à l'état d'esters phosphates dérivant des oses, de la vitamine B1 (cocarboxylase) et de certains nucléosides. Enfin, les résultats publiés par certains auteurs font apparaître une fraction phosphorée dite « résiduelle » de nature indéterminée représentant environ 2 p. 100 du phosphore total.

Nous avons groupé dans le tableau II suivant les quelques résultats publiés intéressant la composition du grain de blé en phosphore minéral lipidique et nucléique.

TABLEAU II

Composition en phosphore minéral, lipidique et nucléique des grains de diverses variétés de blé.

Blés	mg p. 100 g grain			p. 100 du P total			Auteurs
	P min.	P lipid.	P nucl.	P min.	P lipid.	P nucl.	
Italien	—	32	130	—	3,7	15,1	Masoni (1915).
Américain	21	28,3	74,8	5	6,5	17,5	Webster (1928).
Hard Winter	—	30,6	—	—	10,6 (9,4 à 12,7)	—	Guerrant (1927).
Français	—	14	—		3,5	—	Leulier et Chevat (1931).
Polonais	—	—	—	5	26		Wiazownicka (1933).
Italien	—	—	—	10,4	3,7	15,1	Quagliariello (1939).
Australien	11 à 13	—	—	4,2 à 4,9	—	—	Lee et Underwood (1948).
Français	—	—	—	3,7	5,9	8,5	Weiss (1952).

On constatera que c'est principalement la fraction phosphorée lipidique du grain qui a fait l'objet de déterminations quantitatives. Quant à la fraction nucléique, elle reste très mal définie ; le plus souvent, en

effet, elle a été estimée par différence entre le phosphore total et la somme des autres fractions effectivement dosées. Dans les rares cas où l'extraction du phosphore nucléique a été réalisée de façon spécifique, on s'est borné à exprimer une teneur globale sans préciser la part revenant à chacun des deux types d'acides nucléiques.

Les renseignements d'ordre quantitatif concernant le phosphore nucléique sont donc peu abondants, en raison sans doute de sa très faible concentration dans le grain entier. Le germe par contre, où se trouve localisée la quasi totalité des constituants nucléiques, a fait l'objet d'assez nombreuses études qualitatives, consistant à en isoler des préparations nucléiques plus ou moins pures.

La première préparation d'acide ribonucléique fut réalisée par OSBORNE et Coll (1900-1901) à partir du germe de blé dont la teneur approximative fut évaluée environ à 3 p. 100. Également, à partir du germe, READ et TOTTINGHAM (1917) obtinrent une préparation assez voisine dénommée acide triticonucléique en raison de son origine et dont CALVERY et REMSEN (1927) devaient ultérieurement préciser la nature ribonucléique par détermination des nucléotides constituants. Plus récemment, par épuisement du germe de blé par l'eau et précipitation des extraits à pH 4, LUSENA (1951) isole une ribonucléoprotéine avec un rendement de 2,2 p. 100. L'acide ribonucléique est libéré par hydrolyse légère à pH 11 et obtenu à un très grand degré de pureté par précipitations successives. En extrayant le germe de blé par le dodécylsulfonate de sodium KAY et DOUNCE (1953) ont de même isolé une préparation de ribonucléate de sodium. Au cours d'une étude, menée parallèlement sur les glutélines du riz et du blé, KONDO et MORITA (1954) observent que les protéines isolées des grains à caractère non glutineux contiennent une certaine proportion d'acide ribonucléique, évaluée à 2,65 p. 100 dans le cas de la glutéline du riz. Au contraire, les protéines isolées des grains glutineux sont totalement dépourvues d'acide nucléique. Il semblerait donc que chez le blé comme chez le riz, le caractère non glutineux soit relié à la nature nucléoprotéique de leurs glutélines.

On doit à MIRSKY et POLLISTER (1946) la première préparation d'acide désoxyribonucléique obtenue par extraction du germe de blé par le chlorure de sodium. Une méthode d'extraction identique, complétée par une précipitation fractionnée par l'éthanol, devait permettre à LALAND et coll. (1950) d'obtenir, à partir des germes de blé et de seigle, des préparations d'acide désoxyribonucléique assez pures puisque leur teneur respective en ARN était de 4,7 p. 100 pour le blé, et 16 p. 100 pour le seigle. Plus récemment, LIPSHITZ et CHARGAFF (1956) ont présenté une étude détaillée sur le fractionnement de l'ADN isolé du germe de blé et confirmé sa nature par caractérisation du 2-désoxyribose et identification de la méthyl-5-cytosine.

Enfin un travail de DUTTA et coll. (1953) a réalisé la séparation simultanée des acides ribo et désoxyribonucléiques du germe après extraction par le cétyltriméthylammonium (cetavlon) et fractionnement par ClNa.

On sait donc actuellement avec certitude que les deux types d'acides nucléiques sont présents dans le germe. Si l'on a une idée approximative de leur concentration respective dans cette partie du grain, on ignore l'importance qu'occupe chacun d'eux dans le matériel nucléique du grain entier lui-même.

Les divers travaux auxquels nous venons de faire allusion concernaient la composition phosphorée du grain mûr. Mais que sait-on de l'évolution subie par chacun de ces constituants, de leur interaction éventuelle, avant que la composition du grain ne soit définitivement établie? Si nous nous sommes proposés d'en faire une étude détaillée, c'est précisément parce que nos connaissances dans ce domaine sont restées imprécises et fragmentaires.

Deux études, publiées respectivement par WEISS (1952) et CAUMARTIN (1953) ont suivi l'évolution des différentes formes de phosphore du grain de blé au cours de sa germination. En ce qui concerne cette même évolution au cours du mûrissement du grain, nous avons relevé un travail de ROUSSEAUX et SIROT (1920) concernant l'évolution du phosphore total et « soluble » pendant le mois précédant la moisson. Une étude similaire fut présentée ultérieurement par KNOWLES et WATKIN (1931) relative à l'évolution du phosphore minéral, lipidique et phytique dans les épis d'une variété de blé anglais plusieurs semaines avant leur maturité complète. Il semble que des travaux plus récents publiés en 1950 par ZUEV et PORUCHIKOWA, dont nous n'avons pu malheureusement nous procurer l'original, aient apporté une intéressante contribution à cet aspect de la physiologie du grain de blé.

L'étude que nous présentons vient en complément de celle entreprise en 1948 sur la composition protidique, glucidique, lipidique et vitaminique du grain. Parallèlement à l'évolution subie par les constituants phosphorés du grain de blé en voie de formation, nous avons tenté de préciser le rôle qu'il convient d'attribuer à chacun des deux types d'acides nucléiques dans l'élaboration des protéines.

I. — CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Les blés ayant fait l'objet de cette étude (variété Cappelle) ont été cultivés au Centre de Recherches Agronomiques de Versailles. L'essentiel des observations rassemblées intéresse la récolte 1953, certaines déterminations ont néanmoins été effectuées sur la même variété récoltée en 1955.

1. — Préparation des échantillons.

A chaque prélèvement, la sélection du matériel végétal a été faite de telle sorte que les échantillons retenus présentent un stade d'évolution identique par élimination des épis et des grains insuffisamment ou excessivement développés.

Les premiers prélèvements ont été effectués une quinzaine de jours après le début de la floraison, à un stade correspondant sensiblement à l'apparition de l'amidon dans l'albumen ; ils ont été poursuivis jusqu'à un stade voisin de la maturité des grains.

Les grains prélevés ont été immédiatement cryodesséchés [1], puis conservés au froid. Un broyage énergique en présence de neige carbonique a permis d'obtenir des produits homogènes lors des déterminations entreprises. Les échantillons ainsi obtenus avaient une teneur en eau comprise entre 2,6 et 5,5 p. 100.

2. — Méthodes d'analyse.

a) *Extraction et dosage des constituants acido-solubles.*

2 g de blé (poids sec) sont traités 3 fois par 20 cm³ d'acide trichloracétique 10 p. 100 glacé puis par 2 à 3 fois 10 cm³ d'eau glacée. Les extraits séparés par centrifugation sont rassemblés et amenés à 100 cm³.

Sur des fractions aliquotes des extraits trichloracétiques, on détermine le phosphore minéral (P ortho), le phosphore 7 minutes (P7 min) après une hydrolyse de 7 minutes à 100°C en milieu acide 1 N, et le phosphore total. La différence P7 min — P ortho = P labile permet d'estimer le phosphore ayant pour origine le groupement phosphorique terminal de la cocarboxylase et ceux des nucléosides di et triphosphates.

La différence P total acido soluble — P7 min donne les autres formes organiques à groupement phosphorique stable constituées par des traces d'oses phosphates et pour la quasi totalité par les inositolphosphates. En négligeant la très faible erreur commise, on a appelé P phytique le phosphore ainsi estimé par différence.

L'azote total des extraits acido-solubles, représentant la somme (N ammoniacal + N aminé + N peptidique) a été également déterminé.

Phosphore lipidique.

Le résidu insoluble après extraction trichloracétique et lavage est déshydraté par l'alcool à température ordinaire, séché et le produit pulvérulent obtenu est délipidé 3 fois par un mélange alcool (1) éther (3) à l'ébullition. Les extraits éthéro-alcooliques recueillis après centrifu-

[1] Par les soins de MM. GUILBOT et DRAPRON que nous remercions ici.

gation sont rassemblés dans un matras et évaporés. Le phosphore lipidique est dosé après minéralisation du résidu.

b) Extraction et dosage des acides ribonucléique (ARN) et désoxyribonucléique (ADN).

L'importance pondérale de l'amidon contenu dans les blés analysés ne permet pas de leur appliquer la technique de fractionnement de Schmidt et Thanhauser établie pour les tissus animaux et utilisée avec succès dans le cas des levures. L'addition de soude 1 N au résidu délipidé détermine la formation d'un gel épais brunissant rapidement.

Des essais d'élimination de l'amidon par dégradation diastasique à l'aide des amylases α et β se sont révélés peu efficaces, malgré des temps d'action prolongés.

Nous avons tenté d'effectuer l'extraction des acides nucléiques par l'acide perchlorique dans les conditions décrites par Ogur et Rosen (1950) ; mais cette méthode est rendue inapplicable par la teneur en amidon du matériel végétal étudié.

D'autres essais ont été entrepris, consistant à extraire les acides nucléiques par NaCl 10 p. 100 à 80°C et à précipiter les extraits salins par l'éthanol. Mais une fois redissous en milieu acide, les précipités obtenus ne présentaient aucune absorption à 260 $m\mu$, mettant ainsi en évidence qu'aucun constituant de nature nucléique n'avait été extrait dans ces conditions. Il est vraisemblable que le traitement prolongé du résidu végétal par NaCl à chaud solubilise des dextrines qui reprécipitent en milieu alcoolique.

Nous sommes cependant parvenus à éliminer l'action perturbatrice de l'amidon en effectuant l'extraction des acides nucléiques selon la méthode préconisée par Schneider faisant intervenir l'action de l'acide trichloracétique (ATC) 5 p. 100 à 90°C. Dans ces conditions, en effet, les constituants glucidiques du grain ne semblent pas être solubilisés et les extraits obtenus légèrement opalescents peuvent être aisément séparés du résidu insoluble par centrifugation. Voici le mode opératoire suivi :

On traite une partie aliquote du grain broyé débarrassé des constituants acido-solubles et lipidiques (correspondant à 1 g de substance sèche) par 2 fois 10 cm³ d'A. T. C. 5 p. 100 pendant 15 minutes à 90°C. Dans sa technique établie pour les tissus animaux, Schneider fait observer qu'un seul traitement suffit à extraire la totalité des acides nucléiques. Dans le cas qui nous intéresse, où il s'agit d'un produit végétal, nous avons vérifié que deux extractions successives étaient nécessaires; au-delà les extraits obtenus ne montrent aucun maximum d'absorption dans la région de 260 $m\mu$.

Les deux extraits trichloracétiques sont réunis et amenés à 25 cm³

Sur des parties aliquotes, on détermine l'acide désoxyribonucléique et les acides nucléiques totaux à l'aide des techniques décrites plus loin.

Dosage de l'acide désoxyribonucléique.

La très faible teneur des blés analysés en ADN a nécessité l'adoption d'une méthode d'analyse suffisamment sensible et précise.

Les techniques de DISCHE à la diphénylamine et de STUMPF à la cystéine n'ont pu être retenues en raison de leur sensibilité trop faible. Nous nous sommes inspiré de la microméthode proposée par CERIOTTI (1952-1955) fondée sur la coloration jaune que donne l'ADN avec l'indole, comme l'avait signalé DISCHE en 1929.

Telle qu'elle a été proposée par l'auteur dans le cas des tissus animaux (1955) la méthode donne des résultats très satisfaisants à condition d'opérer sur des extraits perchloriques, cet acide étant sans action sur la coloration obtenue. Il est déconseillé par contre de travailler sur des extraits trichloracétiques car l'ATC d'une part réagit avec l'indole, d'autre part diminue la sensibilité de la méthode en inhibant partiellement la réaction entre l'indole et l'ADN.

Force nous étant pour les raisons exposées plus haut de rejeter l'acide perchlorique, nous avons donc utilisé la méthode à l'indole telle qu'elle a été décrite par CERIOTTI en opérant sur des extraits trichloracétiques.

La coloration jaune formée par action de l'indole et de l'ADN est insoluble dans le chloroforme. La spécificité de la réaction résulte du fait que l'ARN, extrait en même temps que l'ADN par les acides perchlorique ou trichloracétique donne avec l'indole une coloration rose extractible par le chloroforme. Dans les mêmes conditions, l'acide perchlorique ne réagit pas ; l'acide trichloracétique donne au contraire une coloration rouge trouble qu'il est toutefois possible d'éliminer par traitement au chloroforme.

Dans nos essais, 3 extractions successives par le chloroforme ont été nécessaires pour éliminer les colorations parasites de l'ARN et de l'ATC, la phase aqueuse étant colorée en jaune. La méthode ainsi pratiquée, sa sensibilité est réduite d'environ 4 fois par rapport à celle obtenue lorsqu'on met en œuvre des extraits perchloriques. Dans nos conditions expérimentales, l'étalonnage a montré que la coloration donnée par une concentration en ADN de 1 γ/cm³ correspond, à 490 mμ, à une densité optique de 0,0045, ce qui donne encore une sensibilité très satisfaisante, la loi de BEER étant suivie à des concentrations comprises entre 10 et 80 γ. En milieu perchlorique, CERIOTTI a établi qu'au maximum d'absorption (490 mμ) 1 γ d'ADN cm³ présente une densité optique de 0,0187.

Selon le stade d'évolution des grains, les déterminations ont été faites sur des prises allant de 0,2 à 0,75 cm³ des 25 cm³ d'extrait trichloracétique obtenu à partir de 1 g de blé (substance sèche).

Dosage des acides nucléiques totaux.

La détermination de la somme ARN + ADN a été faite simultanément par dosage du phosphore total des extraits trichloracétiques et par mesure de leur densité optique en lumière ultraviolette.

Dans ce dernier cas, une prise de 0,25 cm³ d'extrait est diluée à 5 cm³ par HCl N/10 et la densité optique mesurée à 260 $m\mu$ en cuves de quartz au spectophotomètre Unicam. Afin de tenir compte de l'absorption parasite de l'acide trichloracétique dans cette région du spectre, la courbe d'étalonnage a été établie dans les mêmes conditions de dilution à partir d'un échantillon purifié d'ARN de levure.

Estimation de l'acide ribonucléique.

Des essais de dosage de l'ARN par l'intermédiaire du ribose en pratiquant la réaction de Bial à l'orcine sur les extraits trichloracétiques ont conduit à des résultats anormalement élevés. La détermination de l'ARN par cette méthode s'est révélée absolument impossible par suite de l'interférence des pentoses non nucléiques ayant pour origine les pentosanes du grain.

L'ARN présent dans les extraits trichloracétiques ne pouvant être dosé spécifiquement, il a été estimé par différence entre les acides nucléiques totaux déterminés par spectrophotométrie et l'ADN dosé par la réaction à l'indole. Les teneurs en ADN et ARN ainsi établies ont été transformées par le calcul en leurs valeurs de phosphore correspondantes en attribuant à l'ARN et l'ADN une teneur respective en phosphore de 9,6 et 9,8 p. 100.

Phosphore glucidique.

L'extraction trichloracétique à chaud des acides nucléiques laisse un résidu insoluble contenant une certaine proportion de phosphore non nucléique présumé être de nature glucidique. Le dosage de cette forme de phosphore a été fait après minéralisation sulfo-nitrique du résidu insoluble.

Protéines.

L'acide trichloracétique à froid réalisant l'extraction des constituants azotés non protéiques (acides aminés, amides et peptides), les protéines du grain ont été estimées par la différence (N total du grain — N acido soluble) × 5,7, l'azote étant dosé par la méthode classique de Kjeldahl.

II. — RÉSULTATS OBTENUS ET DISCUSSION

Afin d'aider à la comparaison des phénomènes observés parallèlement sur les deux séries d'échantillons (1953 et 1955), les résultats obtenus au cours de ce travail ont été rassemblés en un seul et même

tableau, et exprimés en fonction du nombre de jours après la floraison.

Nous avons jugé utile d'y faire figurer le poids sec de 100 grains aux différents stades de la maturation, un certain nombre de nos résultats analytiques étant en effet rapportés à l'unité « 100 grains » considérée comme entité biologique (voir figures 1, 3 et 4).

Tableau III

Évolution comparée des constituants phosphorés et de l'azote du grain de blé (Var. Cappelle) au cours de sa maturation pour les années 1953 et 1955.

JOURS APRÈS FLORAISON		13	20	23	26	28	29	31	33	35	36	40	42
Poids sec de 100 grains (g)													
	1953	0,47	1,36		2,23		2,90		3,39		3,69		4,62
	1955			1,32		2,19		2,97		3,64		4,24	4,44
mg p. 100 g (poids sec)													
N total	1953	2384	2290		2145		2103		2227		2148		2272
	1955		2470	2280		2370		2030		2310		2610	
P total	1953	530	453		441		434		424		412		420
	1955		410	413		400		415		404		408	
N/P	1953	45	50,5		48,6		48,4		52,5		52,1		54
	1955		60,2	55,2		59,2		48,9		57,1		64	
mg P p. 100 g (poids sec)													
1953	P minéral	224,1	164,7		139,5		95,4		87,6		86,4		105,6
	P phytique + P labile	94,2	106,4		157,5		193,7		212,8		212,8		215
	P lipidique	28,1	42,9		40,7		63,5		44,3		37,4		32
	P glucidique	28,8	29,2		22,3		16,9		17,8		16,6		15,6
	P nucléique	154,8	109,8		81		64,5		61,5		58,8		51,8
	P ARN	86,4	74,6		56		46,3		43,4		41,5		34,7
	P ADN	71	35,4		25,8		18,9		17,4		16,9		16,9
1955	P minéral		140,4	138,6		86,4		58,9		60,5		61,5	
	P labile		25,2	11,4		9,9		6		3		tr.	
	P phytique		76,4	122,2		185,7		238,1		250,5		246,7	
	P lipidique		60,3	50,8		43		41,7		34		32,5	
	P nucléique + P gluc		112,5	95,4		75,3		69,8		59,4		64,8	
p. 100 du P total													
1953	P minéral	42,3	36,3		31,6		22		20,6		20,9		25
	P phytique + P labile	17,8	23,4		35,7		44,6		50,1		51,6		51,2
	P lipidique	5,3	9,4		9,2		14,6		10,4		9		7,6
	P glucidique	5,4	6,4		5		3,9		4,2		4		3,7
	P nucléique	29,2	24,2		18,3		14,8		14,5		14,2		12,1
1955	P minéral		34,2	33,4		21,6		14,2		14,9		15	
	P labile		6,4	2,7		2,5		<2		<1		tr	
	P phytique		18,6	29,5		46,4		57,2		62		61	
	P lipidique		14,7	12,2		10,7		10		8,4		8	
	P nucléique + P gluc		27,4	23		18,8		16,8		14,7		15,8	
1953 (mg p. 100 g (poids sec))	A.R.N.	900	777		584		482		452		432		361
	A.D.N.	725	361		263		193		178		173		172
	N protéique	1607	1772		1823		–		2007		1938		2062
	ARN/ADN	1,24	2,15		2,22		2,49		2,54		2,50		2,10
mg ARN p. mg N protéique		0,56	0,44		0,32		–		0,22		0,22		0,17

I. — Évolution de l'azote et du phosphore total.

Les résultats du tableau III permettent de constater que la teneur des grains en azote et en phosphore subit relativement peu de fluctuations au cours de la maturation.

En ce qui concerne l'azote, sa concentration dans le grain semble diminuer légèrement jusqu'à une valeur minimum se situant vers le 30e jour après la floraison, pour s'élever de nouveau jusqu'à la maturité complète. Néanmoins, certaines teneurs (après 33 jours pour la récolte

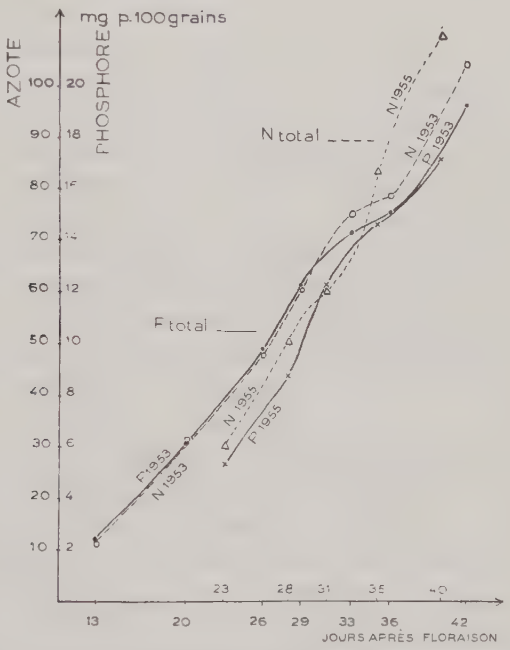


FIG. 1. — Évolution comparée de l'azote et du phosphore du grain pour les années 1953 et 1955.

1953, après 28 jours pour celle de 1955) se situent en dehors de cette évolution. Par ailleurs, on n'observe pas de différences très marquées d'une récolte à l'autre.

La teneur du grain en P total semble évoluer de façon quelque peu différente si on considère les résultats de 1953. Assez élevée aux premiers stades de formation du grain, elle diminue de façon progressive pour atteindre une valeur pratiquement constante 30 jours après la floraison; cette évolution n'apparaît pas avec le blé de 1955 et sa teneur en P total, très proche d'ailleurs de celle du blé 1953, semble stabilisée dès le 20e jour après la floraison. Dans ce dernier cas seulement, nous vérifions les observations antérieures de ROUSSEAUX et SIROT (1920) selon lesquelles la

teneur en phosphore total du grain en voie de maturation reste pratiquement constante pendant le mois précédant la moisson.

Quant au rapport N/P, il n'apparaît pas aussi caractéristique de l'évolution du grain que nous l'avions supposé : pour les échantillons 1953, il s'accroît à peu près régulièrement en passant de 45 à 54, mais varie de façon désordonnée pour les blés de l'autre série. On constate seulement que la valeur de ce rapport N/P dans le grain mûr n'est pas identique pour les deux récoltes. Les teneurs en P total étant très voisines, cette différence provient surtout d'une disparité dans les teneurs en N total, dont les conditions de développement de la plante sont sans doute la cause.

Les courbes de la figure 1 qui expriment l'évolution des quantités d'azote et de phosphore total contenues dans 100 grains font apparaître toutefois que l'activité du blé à synthétiser ses constituants phosphorés et azotés ne varie guère d'une récolte à l'autre.

Avec l'azote on retrouve l'allure caractéristique des courbes obtenues en 1946 à partir de la variété « Inversal ». Il se produit un accroissement continu de la quantité d'azote accumulée dans 100 grains, exception faite du léger palier qui se manifeste vers le 33ᵉ jour après la floraison pour le blé 1953, vers le 30ᵉ jour pour le blé 1955.

Les courbes relatives au phosphore traduisent une évolution identique à celle de l'azote faisant apparaître un fléchissement se situant approximativement au même stade. Nous verrons plus loin que l'évolution respective des diverses formes phosphorées accuse également certaines modifications à une étape du développement qui coïncide avec une stabilisation de la teneur en eau des grains, dont GESLIN et JONARD (1948) ont révélé l'importance du point de vue bioclimatologique.

Évolution des diverses formes phosphorées.

Les méthodes d'analyse précédemment décrites ont permis de déterminer la composition du grain de blé en ses diverses formes phosphorées minérales et organiques à différents stades de son développement, de définir leur évolution respective et de préciser en quel sens certaines formes du métabolisme du phosphore sont susceptibles de participer à la synthèse des protéines du grain.

C'est ainsi que nous avons déterminé simultanément la teneur des blés étudiés en phosphore minéral, labile, phytique, lipidique, glucidique et nucléique, en précisant pour ce dernier les proportions respectives du phosphore ribonucléique et désoxyribonucléique.

Les résultats intéressant chaque récolte sont présentés séparément dans le tableau III. Dans la partie supérieure figurent les teneurs des échantillons analysés aux différents stades,exprimées pour chaque fraction phosphorée en mg de P/100 g de grain sec. Leur faisant suite, un

second groupe de résultats indique les proportions respectives de chaque constituant exprimées en p. 100 du phosphore total. Les modifications apportées à la répartition des diverses formes phosphorées dans le grain en voie de maturation sont ainsi mieux mises en évidence et la comparaison entre les deux années en est facilitée. Figurent enfin dans la partie inférieure du tableau III les teneurs des grains 1953 en acides ribonucléique (ARN) et désoxyribonucléique (ADN), en azote protéique, les rapports ARN/ADN correspondants et la quantité d'ARN formé (mg) par mg d'azote protéique.

Considérons d'abord parallèlement pour les deux récoltes comment évolue la concentration des différentes formes de phosphore et de leurs proportions dans le grain sec.

Dans les premiers stades de sa formation, le grain (blé 1953) présente une teneur élevée en P minéral puisque celui-ci constitue 42 p. 100 du P total 13 jours après la floraison. Cette teneur s'abaisse assez rapidement pour atteindre une valeur sensiblement constante vers le 30e jour. On pourrait penser que cet appauvrissement du grain en P minéral s'effectue au bénéfice de l'ensemble des constituants organiques. Or, les résultats montrent que seule la teneur en P phytique s'accroît dans des proportions d'ailleurs importantes, alors que le grain s'appauvrit de façon lente mais progressive en ses autres constituants organiques. Dans le cas du blé de 1953, seule la teneur en P lipidique semble évoluer en passant par un maximum.

En trois semaines, la teneur du grain sec (blé 1955) en P phytique est plus que triplée, puisqu'elle passe de 76 à 247 mg p. 100 g. En ce qui concerne les autres formes organiques, l'abaissement de leur concentration dans le grain semble évoluer de façon différente.

Le P lipidique (blé 1955) et le P glucidique (blé 1953) sont réduits d'environ moitié lorsque le grain est parvenu à maturité. Quant au P labile constitué, nous l'avons vu, des groupements phosphates facilement hydrolysables de certaines molécules de nature nucléotidique, sa concentration dans le grain diminue très rapidement (blé 1953) jusqu'à devenir indosable. Enfin le grain mûr contient 3 fois moins de P nucléique qu'aux premiers stades de son développement.

Les 155 mg de P nucléique que contiennent 100 g de grain sec 13 jours après la floraison sont d'ailleurs réduits à 110 au 2e jour. C'est principalement le P désoxynucléique qui accuse la chute la plus marquée puisqu'en fin de maturation, le grain ne contient plus que le quart de sa teneur initiale (17 contre 71 mg) ; dans le même temps, la concentration du P ribonucléique dans le grain n'est réduite que d'un peu plus de la moitié (de 86 à 35 mg).

Les observations précédentes sont illustrées par la figure 2 traduisant l'évolution des proportions respectives des diverses formes de

phosphore du grain, exprimées en p. 100 du phosphore total. Les valeurs figurant sur le tableau III permettent une comparaison entre les années 1953 et 1955.

Les courbes de la figure 2 indiquent l'accroissement très rapide du taux du phosphore phytique et inversement l'abaissement lent et progressif de celui des autres formes organiques. Le taux de phosphore minéral accuse une baisse nettement plus marquée et son évolution est à peu de chose près la symétrique inverse de celle du phosphore phytique. Les proportions des constituants phosphorés du grain semblent définitivement fixées vers le 35e jour après la floraison ainsi qu'en témoignent les paliers présentés par chaque courbe à partir de ce stade.

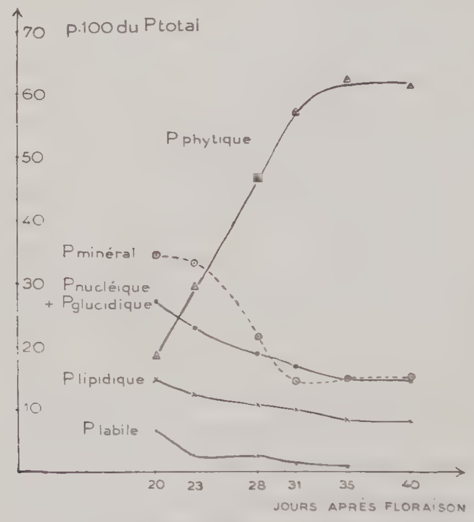


FIG. 2. — Évolution des diverses formes de phosphore du grain rapportées au phosphore total (Cappelle, 1955).

Il faut sans doute faire un parallèle entre le taux en phosphore minéral observé ici et celui en « phosphore soluble » signalé par ROUSSEAUX et SIROT (1920) au cours de la maturation du grain de blé, le phosphore phytique, ainsi que celui des divers esters phosphates, étant également solubles mais en milieu acide. Quoiqu'il en soit, nous retrouvons dans nos observations certains des faits signalés par KNOWLES et WATKIN (1931) selon lesquels l'enrichissement en P phytique des épis avant la moisson s'accompagne d'un abaissement de leur teneur en P minéral. En ce qui concerne le P lipidique, ces auteurs ont constaté un léger accroissement de sa concentration dans les épis en notant toutefois un abaissement de sa proportion par rapport au P total par suite de l'enrichissement rapide en P phytique. L'évolution des autres constituants phosphorés n'a pas été étudiée, il semble toutefois que les phénomènes observés par KNOWLES

et WATKIN dans les épis soient identiques à ceux que nous avons constatés nous-mêmes sur le grain.

Il est à noter que les proportions des divers constituants phosphorés des grains mûrs établies pour 2 récoltes différentes sont extrêmement voisines. C'est ainsi que pour les récoltes 1953 et 1955, le P lipidique constitue respectivement 7,6 et 8 p. 100 du P total, la somme P nucléique + P glucidique 15,9 et 15,8 p. 100. Seules diffèrent les proportions de P minéral (25 p. 100 contre 15 p. 100) et de P phytique (51 p. 100 contre 60 p. 100). Il est possible que des conditions de développement différentes en soient la cause. Nous pensons plutôt que la proportion plus élevée de P minéral et, inversement, plus faible de P phytique constatée pour les échantillons de 1953 doive être attribuée à une hydrolyse enzymatique partielle de l'acide phytique sous l'action de la phytase des grains. Il faut en effet tenir compte que les blés de 1953 ont été analysés en même temps que ceux de 1955 et que leur conservation prolongée peut fort bien s'être accompagnée d'une action lente de la phytase et par suite d'une libération de P minéral. Si on réduit la proportion de P minéral du blé 1953 de 25 à 15 p. 100, celle du P phytique passe elle-même de 51 à 61 p. 100 et nous retrouvons alors les mêmes pourcentages que dans le grain mûr récolté deux ans plus tard.

Dans la mesure où nos observations peuvent être généralisées, il semblerait que les proportions respectives des divers constituants phosphorés du grain de blé mûr soient constantes à l'intérieur d'une même variété et qu'elles ne sont pas modifiées d'une récolte à l'autre par les facteurs du milieu.

Il est par ailleurs intéressant de comparer les résultats obtenus dans cette étude avec ceux obtenus par les auteurs précédemment cités.

Le taux en P phytique des blés analysés se révèle faible, même si on considère la valeur la plus forte (61 p. 100 du P total). Compte tenu des chiffres publiés, cette proportion classerait Cappelle, qui est un blé tendre, dans la catégorie des blés durs, si tant est que les taux en phosphore phytique permettent une telle distinction. Inversement, la proportion de P minéral apparaît nettement supérieure aux quelques valeurs publiées.

La proportion de 8 p. 100 en P lipidique que nous avons obtenue semble correspondre à une moyenne des taux rapportés par ailleurs. Quant au P nucléique constituant 12,2 p. 100 du P total pour le blé de 1953, sa proportion apparaît sensiblement inférieure à celles qui ont été mentionnées dans le tableau II.

Par contre, la somme (P nucléique + P glucidique) représente un pourcentage (15,8 p. 100) assez voisin des chiffres publiés. Le plus souvent en effet, le P nucléique n'a pas été déterminé après extraction spécifique des acides nucléiques, mais estimé par différence ou dosé en mélange avec le P résiduel; le taux plus faible de 8,5 p. 100 indiqué par WEISS

(1952) a été obtenu après extraction trichloracétique des constituants nucléiques du grain.

En ce qui concerne la distinction entre les deux types d'acides nucléiques à l'aide des méthodes décrites plus haut, nous voyons que le P ribonucléique constitue 8,2 p. 100 du P total du grain mûr, le P désoxyribonucléique 4 p. 100 seulement.

La proportion du phosphore dosable dans le résidu végétal après élimination des diverses formes phosphorées du grain représente 4 p. 100 du P total. Ce phosphore résiduel, que nous avons qualifié de glucidique,

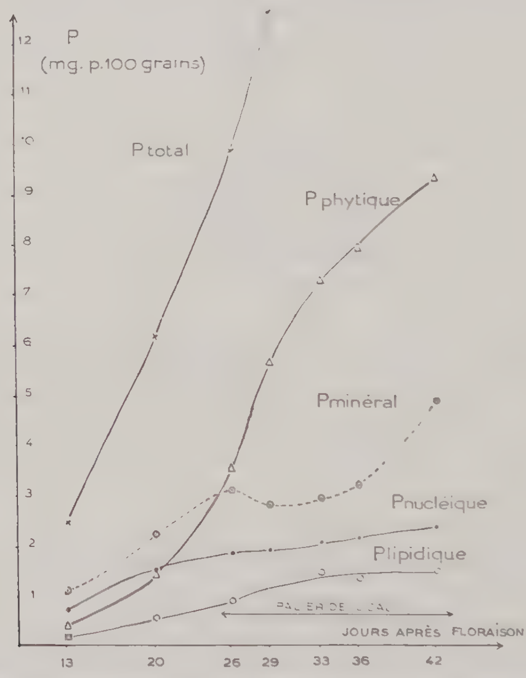


FIG. 3. — Évolution des diverses formes de phosphore du blé rapportées à 100 grains (Cappelle, 1953).

ne peut en effet être considéré comme étant de nature nucléique. Nous avons indiqué qu'au-delà des deux traitements trichloracétiques nécessaires à l'extraction totale des acides nucléiques, les extraits ne présentaient plus l'absorption caractéristique au voisinage de 260-265 mμ. Le matériel végétal qui subsiste à ce stade du fractionnement chimique du grain est de nature exclusivement protéique et glucidique. Il est peu probable que le P résiduel soit lié aux protéines ; on n'a jamais signalé l'existence de phospho-protéines dans le blé. Il est en revanche beaucoup plus certain que le phosphore ainsi dosé ait une origine glucidique ; il pourrait s'agir d'une forme liée à l'amidon. On sait que les préparations d'amidon les plus pures contiennent toujours une certaine quantité de phosphore

variable selon l'origine de cet amidon. Une fraction de ce phosphore est extractible par les solvants des lipides. En ce qui concerne l'amidon de blé délipidé, sa teneur en phosphore est de l'ordre de 0,03 p. 100. Si on considère que le grain de blé renferme environ 60 p. 100 d'amidon (poids sec), 100 g de grain sec contiendraient 18 mg de phosphore lié à l'amidon. Nos résultats indiquent 15,6 mg p. 100 g.

Indépendamment de l'ensemble des observations précédentes, un autre aspect de l'évolution des différentes formes de phosphore du grain peut être donné si, au lieu de tenir compte de la teneur en ces constituants ou de leur taux respectif, on considère la quantité de telle ou telle forme de phosphore contenue dans 100 grains. Ainsi présentés, les résultats expriment l'activité de la plante à effectuer la synthèse des divers constituants phosphorés accumulés dans le grain. C'est ce que veut illustrer la figure 3 suivante relative au blé 1953.

On constate que l'activité de la plante à synthétiser le P phytique du grain est considérable ; la courbe d'évolution en forme d'S est caractéristique des phénomènes de croissance. Alors que, comme nous l'avons vu, la matière sèche du grain s'appauvrit progressivement en ses autres formes de P organique, l'entité biologique constituée par 100 grains s'enrichit lentement en P nucléique et P lipidique. L'accumulation du P minéral évolue de façon notablement différente ; l'abaissement de sa concentration à partir du 26e jour est vraisemblablement l'indice d'un ralentissement de la plante à synthétiser ses constituants organiques autres que l'acide phytique si on considère à ce stade le léger changement de pente des courbes relatives au P nucléique et lipidique. Il est intéressant de noter que ces modifications coïncident avec le début du palier de l'eau, période du développement où la teneur en eau des grains demeure constante et où l'activité de synthèse semble se trouver freinée. La nouvelle accumulation de P minéral observée à partir du 33e jour après la floraison peut s'expliquer soit par une nouvelle activité métabolique du grain précédant la fin du palier de l'eau, soit plus probablement par une hydrolyse partielle de l'acide phytique par la phytase.

3. — Évolution comparée des acides nucléiques et des protéines.

Dans sa partie inférieure, le tableau III fait état des teneurs du grain de blé en ARN, ADN et azote protéique aux différentes étapes de sa maturation (blé 1953). Qu'indiquent les résultats obtenus?

Deux semaines environ après la floraison, le jeune grain contient pour 100 g de matière sèche environ 1,6 g d'acides nucléiques dont le rapport ARN/ADN est de 1,24. Parvenu à maturité, sa teneur en acides nucléiques a diminuéd'e nviron 3 fois, elle n'est plus que de 0,53 g p. 100 g. et le rapport ARN/ADN est passé à 2,10.

La valeur de ce rapport au cours de la maturation s'accroît légèrement jusqu'au 33e jour pour décroître ensuite ; toujours supérieur à l'unité, il indique que la composition nucléique du grain est caractérisée à tous les stades par la prédominance quantitative de l'ARN.

On notera toutefois par la valeur beaucoup plus faible du rapport ARN/ADN au 13e jour après la floraison que la prédominance de l'ARN est beaucoup moins marquée dans ces premiers stades du développement. La richesse relative en ADN du grain nouvellement formé est caractéristique des tissus jeunes, dont les cellules présentent un noyau de taille importante.

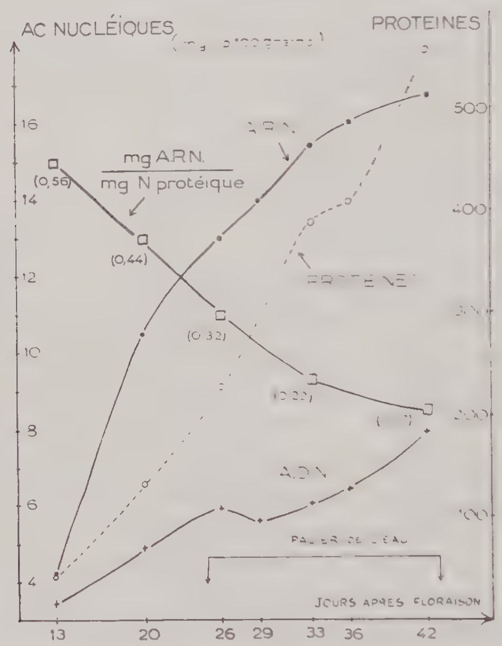


FIG. 4. — Évolution comparée de l'ARN, de l'ADN et des protéines dans 100 grains (Cappelle 1953).

La rapide accumulation par le grain de substances de réserve détermine du point de vue quantitatif une dilution des constituants nucléiques et, sous l'aspect histologique, leur concentration dans les tissus de l'embryon. On assiste alors à une réduction du noyau cellulaire ce qui explique l'élévation rapide du rapport ARN/ADN.

Ainsi en 7 jours (entre le 13e et le 20e jour après la floraison) la teneur du grain en ADN est réduite de moitié, celle en ARN de 13 p. 100 seulement. Nous avons reproduit dans la figure 4 l'évolution respective des quantités d'ARN et d'ADN contenues dans 100 grains, traduisant l'activité de la céréale à synthétiser les deux types d'acides nucléiques.

On peut constater que cette évolution diffère notablement de l'un

à l'autre. Alors que la biosynthèse de l'ADN est lente, celle de l'ARN est rapide : 13 jours après la floraison, 100 grains contiennent 3,4 mg d'ADN et 4,2 mg d'ARN. Lorsque la maturité est atteinte, on trouve dans 100 grains 16,7 mg d'ARN contre seulement 8 mg d'ADN. En outre, la courbe d'évolution de l'ADN présente une inflexion marquée dès le début du palier de l'eau ; au même stade la courbe relative à l'ARN accuse une inflexion à peine décelable.

Parallèlement à l'évolution des deux acides nucléiques, nous avons rapporté dans la figure 4 celle des protéines en modifiant convenablement l'échelle des ordonnées. La courbe traduisant l'activité de synthèse protéique du grain fait apparaître une progression rapide interrompue par une inflexion marquée entre les 33 et 36e jours, se situant à peu près vers le milieu du palier de l'eau.

Si l'on compare alors la vitesse d'accumulation dans 100 grains des constituants nucléiques et protéiques, il apparaît une certaine analogie entre l'évolution des protéines et celle de l'ARN, bien que les courbes ne soient pas superposables. Jusqu'au 29e jour après la floraison, la vitesse de synthèse de l'ARN se révèle plus élevée que celle des protéines et le très léger infléchissement qui se manifeste ensuite, alors que débute le palier de l'eau, semble se refléter de façon plus marquée après quelques jours dans l'accumulation des protéines. Au-delà, la biosynthèse de l'ARN est ralentie alors que celle des protéines se poursuit. Tout semble se dérouler, du moins jusque vers le 33e jour après la floraison, comme si la production des protéines du grain était conditionnée au préalable par celle de l'ARN.

Au-delà, la synthèse se poursuivrait indépendamment jusqu'à ce que soit atteinte la composition définitive des grains.

Quant à l'ADN, sa production au cours du développement des grains ne semble pas présenter d'analogie avec celle des protéines si l'on en juge par l'allure de la courbe obtenue.

Si donc il existe une corrélation quelconque entre l'ARN et la synthèse protéique, il doit être possible de montrer qu'une modification de la concentration en ARN se reflète dans le taux de protéines formées. C'est dans ce but que nous avons déterminé à chaque étape de la maturation, la quantité d'ARN synthétisée (en mg) par mg d'azote protéique formé. Les valeurs obtenues sont indiquées dans le tableau III et l'évolution de ce rapport en fonction du temps est traduite par la courbe correspondante rapportée dans la figure 4. On constate alors que la quantité d'ARN par mg d'azote protéique décroît progressivement et que la relation est sensiblement linéaire jusqu'au 33e jour, après quoi la courbe s'infléchit.

Le fait qu'il existe une proportionnalité entre les deux phénomènes semblerait indiquer que la formation de l'ARN est nécessaire à la synthèse

des protéines et ceci d'autant plus que le grain est moins développé. Dans les tout premiers stades de formation du grain, l'ARN serait en quelque sorte l'initiateur de la synthèse protéique ; une fois la réaction amorcée à l'image d'une réaction en chaîne, sa propre synthèse serait inversement proportionnelle à celle des protéines.

Compte tenu du fait que les résultats qui viennent d'être exposés ne concernent qu'une seule étude, il convient de formuler avec une certaine réserve les conclusions qui s'en dégagent.

De nombreux faits, rassemblés principalement dans le domaine animal, ont conclu également à une corrélation entre l'ARN et la synthèse des protéines. Mais le mécanisme par lequel l'acide nucléique est censé agir demeure encore obscur. D'autres faits expérimentaux par ailleurs ne sont pas parvenus à mettre en évidence une telle corrélation et il semblerait, pour l'instant du moins, selon l'opinion exprimée par Davidson (1953), que le lien entre l'ARN et la synthèse protéique n'est peut-être qu'une question de coïncidence et que ce lien est peut-être moins étroit que d'aucuns l'ont supposé initialement.

Il faut cependant souligner l'analogie entre les conclusions qui se dégagent de ce travail sur le blé et celles formulées par Konarev (1955) considérant que chez le pois, le phosphore et l'azote participent à la protéosynthèse par l'intermédiaire de l'ARN.

Même si elle n'a fait qu'entrevoir certains des processus biochimiques par lesquels le grain de blé effectue la synthèse de ses protéines, cette étude trouve sa justification dans l'importance même du rôle exercé par les protéines vis-à-vis de la qualité boulangère des blés et des farines.

III. — CONCLUSIONS

Les faits essentiels suivants se dégagent des résultats qui viennent d'être exposés :

D'une récolte à l'autre, la teneur du grain de blé en phosphore total n'accuse pas de variations très marquées au cours de la maturation. Par contre, alors qu'il s'appauvrit progressivement en phosphore minéral, le grain accumule d'importantes quantités de phosphore phytique atteignant en fin de maturation environ 3 fois la teneur initiale.

Parallèlement, on assiste à un abaissement à peu près continu des autres formes phosphorées organiques, plus particulièrement marqué dans le cas du phosphore nucléique.

Dans le grain néo-formé, les formes minérales, phytique, lipidique, glucidique et nucléique, constituent respectivement 42,3-17,8-5,3-5,4 et 29,2 p. 100 du phosphore total. Dans le grain mûr, les pourcentages correspondants sont de 25-51-7,6-3,7 et 12,1. Les proportions des différentes formes de phosphore semblent définitivement établies vers le 35^{e}

jour après la floraison et n'apparaissent pas modifiées sensiblement d'une récolte à l'autre. Quant au phosphore ribonucléique, de 16,3 p. 100 du phosphore total dans le jeune grain, il passe à 8,2 p. 100 dans le grain mûr, les proportions correspondantes étant de 13,4 et 4 p. 100 pour le phosphore désoxyribonucléique.

L'évolution respective du phosphore phytique et nucléique reflète assez fidèlement le comportement physiologique du grain au cours de sa maturation. Aux premiers stades de leur formation, les tissus du jeune grain manifestent une activité métabolique intense : les formes phosphorées « actives » (acides nucléiques) prédominent sur les formes de réserve (acide phytique). L'accumulation progressive des réserves glucidiques et protéiques limite de plus en plus cette activité jusqu'à la maturité complète du grain dont les seuls tissus vivants sont alors réduits à l'embryon. A ce stade une très importante fraction du phosphore a été mise en réserve sous forme phytique alors que le phosphore nucléique se trouve rassemblé dans la région limitée du grain occupée par le germe.

Cette transformation des tissus jeunes du grain en tissus de réserve est encore illustrée par l'abaissement de leur teneur en acide désoxyribonucléique laquelle, de 900 mg p. 100 g de substance sèche 13 jours après la floraison, n'est plus que de 360 mg dans le grain mûr, le rapport $\frac{\text{ARN}}{\text{ADN}}$ passant lui-même de 1,24 à 2,50.

Rapportée à 100 grains, la teneur en phosphore total du blé au cours de la maturation semble évoluer de façon assez comparable d'une récolte à l'autre, la même observation s'appliquant à l'azote total. Exprimée sous cette forme, l'activité de la plante à synthétiser les constituants phosphorés organiques du grain apparaît particulièrement intense pour le phosphore phytique, beaucoup plus lente et progressive pour les formes lipidiques et nucléiques ; on observe en outre une modification plus ou moins marquée de cette activité lorsque se manifeste le palier de l'eau.

Par ailleurs, jusque vers le 33e jour après la floraison, la vitesse d'accumulation de l'acide ribonucléique dans 100 grains est plus grande que celle des protéines. Dans le même temps, la quantité (en mg) d'acide ribonucléique synthétisé par mg d'azote protéique formé décroît de façon linéaire. Ces faits sembleraient indiquer que la synthèse des protéines est conditionnée par celle de l'acide ribonucléique et ceci d'autant plus que le grain est moins développé.

Tout en précisant la composition du grain de blé en ses constituants phosphorés essentiels aux diverses étapes de sa croissance, cette étude nous renseigne sur l'activité de la plante à synthétiser et accumuler dans le grain ses diverses formes de phosphore au cours de la maturation. Elle laisse également entrevoir le rôle possible de certains de ces constituants phosphorés dans l'élaboration des protéines.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANDREWS et BAILEY. — *Ind. Eng. Chem.*, **24**, 80, (1932), cité par BAILEY.

BAILEY (C. H.). — The constituents of wheat flour and wheat products. Reinhold Publ. C°, N. Y. (1944).

BIGWOOD (E. J.). — Observations concernant l'acide phytique du grain de froment. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33**, 1261, (1951).

CALVERY (H. O.) et REMSEN (D. B.). — The nucleotides of triticonucleic acid. J. *Biol. Chem.*, **73**, 593, (1927).

CAUMARTIN (V.). — Évolution des composés de l'anhydride phosphorique dans le caryopse pendant la germination en terre fertile d'une variété de blé de printemps. *C. R. Acad. Sc.*, **237**, 743, (1953).

CERIOTTI (G.). — A microchemical determination of desoxyribonucleic acid *J. Biol. Chem.*, **198**, 297, (1952).

CERIOTTI (G.). — Determination of nucleic acids in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **214**, 59, (1955).

COMMON. — *The Analyst*, **65**, 79, (1940), cité par BIGWOOD.

COURTOIS (J.) et PEREZ (G.). — Teneur en inositophosphates et activité phytasique de diverses graines. *J. Sc. Pain*, 143, (1948).

DAVIDSON (J. N.). — Les nucléoprotéines et la croissance des tissus. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **35**, 49, (1953).

DUTTA (S. K.), JONES (A. S.) et STACEY (M.). — The separation of pentose nucleic and desoxypentose nucleic acids. *Bioch. Biophys. Acta*, **10**, 613, (1953).

FEYTE (A.). — Appréciation des qualités des blés et des farines. *C. R. Acad. Agr. Fr.*, **19**, 925, (1933), cité par BAILEY.

GESLIN (H.) et JONARD (J.). — Maturation du blé et climat. *J. Sc. du pain. Ann. Nutr. alim.*, **2**, 111, (1948).

GUERRANT. — *J. Agr. Res.*, **35**, 1001, (1927), cité par BAILEY.

GUILLEMET (R.). — L'acide phytique : étude biochimique et physiologique. *Biologie médicale*, **35**, 1, (1946).

HAY (J. G.). — Distribution of phytic acid in wheat and preliminary study of some of the calcium salts of this acid. *Cereal Chem.*, **19**, 326, (1942).

HINTON (J. J. C.). — *Biochem. J.*, **38**, 214, (1944), cité par BIGWOOD.

KAY (E. R. M.) et DOUNCE (A. L.). — The preparation of sodium ribonucleate with sodium dodecylsulfate. *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 4041, (1953).

KNOWLES et WATKIN. — *J. Agr. Soc.*, **21**, 612, (1931), cité par BAILEY.

KONAREV (V. G.) (en russe). — Sur le rôle de l'azote et du phosphore dans la formation des protéides et des acides nucléiques chez les plantes. *Dokl. Akad. Nauk.*, SSSR, **100**, 515, (1955).

KONDO (K.) et MORITA (Y.). — Studies on proteins : nucleic acid in rice glutenin. *Bull. Res. Inst. Food. Sc. Kyoto Univ.*, n° 15, 1, (1954).

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET PHYSICO-CHIMIE DES CÉRÉALES. — Sur l'évolution du contenu du grain de blé de la fécondation à la maturité. *Ann. Nutr. Alim.*, **2**, 123, (1948).

LALAND (S.), OVEREND (W. G.) et WEBB (M.). — The isolation of desoxyribonucleic acids from rye and wheat. *Acta. Chem. Scand.*, **4**, 885, (1950).

LEE (J. W.) et UNDERWOOD (E. J.). — The total phosphorus, phytate phosphorus and inorganic phosphorus of wheat and its mill products. *Austral J. Exp. biol. Med. Sc.*, **26**, 413, (1948).

LEULIER et CHEVAT. — *J. Pharm. Chim.*, **14**, 214, (1931), cité par BAILEY.

LIPSHITZ (R.) et CHARGAFF (E.). — Studies on nucleoproteins. IV. Preparation of desoxyribonucleoproteins and fractionation of the desoxyribonucleic acid of wheat germ. *Biochim. Biophys. Acta*, **19**, 256, (1956).

LUSENA (C. V.). — Preparation of ribonucleoproteins and ribonucleic acid from wheat germ. *Cereal Chem.*, **28**, 400, (1951).
MAC CANCE (R. A.), WIDDOWSON (E. M.), MORAN (T.), PRINGLE (W. J. S.) et MACRAE (T. F.). — The chemical composition of wheat and rye and of flours derived therefrom. *Biochem. J.*, **39**, 213, (1945).
MASONI. — *Staz. Sper. Agr. Ital.*, **48**, 385, (1915), cité par BAILEY.
MIRSKY (A. E.) et POLLISTER (A. W.). — Chromosin, a desoxyribose nucleoprotein complex of the cell nucleus. *J. Gen. Physiol.*, **30**, 117, (1946).
OGUR (M.) et ROSEN (G.). — The nucleic acids of plant tissue. I The extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. *Arch. Biochem.*, **25**, 262, (1950).
OSBORNE (T. B.) et CAMPBELL (G. F.). — Nucleic acid of the embryo of wheat and its protein compounds. *J. Amer. Chem. Soc.*, **22**, 379, (1900).
OSBORNE (T. B.) et HARRIS (I. F.). — The nucleic acid of the wheat embryo. *Report Connect. Agr. Exper. Station.*, 365-430, (1901).
PRINGLE (W. J. S.) et MORAN (T.). — Phytic acid and its destruction in baking. *J. Soc. Chem. Industr.*, **61**, 108, (1942).
QUAGLIARIELLO. — *Quaderni Nutriz.*, **6**, 276, (1939), cité par BAILEY.
READ (B. E.) et TOTTINGHAM (W. E.). — Triticonucleic acid. *J. Biol. Chem.*, **31**, 295, (1917).
ROUSSEAUX et SIROT (M.). — *C. R. Acad. Sc.*, **171**, 578, (1920), cités par BAILEY.
SULLIVAN (B.) et NEAR (C.). — Lipoid phosphorus of wheat and its distribution. *Cereal Chem.*, **163**, (1928).
WEBSTER. — *J. Agr. Res.*, **37**, 123, (1928), cité par BAILEY.
WEISS (R.). — Évolution des principales formes de phosphore au cours de la germination des grains. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **34**, 471, (1952).
WIAZOWNICKA. — *Bull. Acad. Polon. Sc. Let.* (B), 107, (1933), cité par BAILEY.
YOUNG et GREAVES. — *Food Research*, **5**, 103, (1940), cité par BAILEY.
ZUEV (L. A.) et PORUCHIKOVA (V. I.). — Transformation of phosphorus compounds in the grains of spring wheat during their ripening. *Doklady Akad. Nauk. SSSR*, **70**, 469, (1950).

RECHERCHES SUR LE MEILLEUR ÉQUILIBRE DENSITÉ DE PLANTES FERTILISATION AZOTÉE DU BLÉ D'HIVER

PAR

Y. COÏC
Station centrale de Physiologie végétale, Versailles.

I. — INTRODUCTION

Pour mieux comprendre l'action des divers facteurs agissant sur le rendement du blé, on décompose souvent celui-ci en produit de trois « composantes » : rendement en grain à l'hectare = nombre d'épis à l'hectare × nombre moyen de grains par épi × poids moyen d'un grain.

Pour obtenir le meilleur rendement possible il faut, pour un milieu donné, combiner judicieusement la grandeur de chacune de ces composantes. On sait quelle est l'importance de l'action de la nutrition azotée sur la grandeur de chacune de celles-ci et aussi sur la conduite de leur combinaison judicieuse (1) (2). On sait l'importance, justifiée, qu'attache l'agriculteur à la première composante : le nombre d'épis à l'unité de surface de terrain. On peut encore décomposer celle-ci en un produit de deux facteurs : nombre de plantes à l'unité de surface × nombre moyen de talles, pour faire apparaître le terme de tallage. On connaît l'action de la nutrition azotée sur le « tallage » et plus particulièrement l'action de la fertilisation azotée apportée à la fin de l'hiver sur cette première phase de croissance active du blé d'hiver. En fait, le « tallage » précédemment défini (nombre d'épis par plante) fait intervenir, non seulement ce qui se passe pendant la phase de tallage proprement dite, mais aussi ce qui se passe pendant la montaison, ainsi que nous le verrons d'ailleurs dans cette note.

L'objet de l'expérience décrite est la recherche du meilleur équilibre entre densité de plantes et fertilisation azotée du blé d'hiver pour l'obtention de la densité d'épis optimum et, par suite, du meilleur rendement en grain dans le milieu expérimenté et, surtout, de tirer des résultats de

l'expérience quelques idées générales permettant de mieux se rendre compte des possibilités que nous avons dans ce domaine.

Evidemment, la densité de semis nécessaire pour obtenir un certain nombre de plantes et un certain nombre d'épis à l'unité de surface dépend de très nombreux facteurs : variété, date de semis, milieu (climat, sol), valeur de la semence (faculté et énergie germinative...), etc. Nous n'avons expérimenté que le meilleur équilibre : densité de plantes — fertilisation azotée du blé d'hiver.

II. — CONDITIONS DE L'ESSAI ET PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL [1]

La variété Cappelle a été utilisée. Le sol est un excellent limon riche en acide phosphorique et potasse assimilables. Le précédent cultural était : pommes de terre. La quantité d'azote assimilable fourni au sol pendant sa végétation était très forte, ainsi que nous le verrons (en apportant seulement 40 kg N ha, on a obtenu 52 qx ha de grain) (2). Il y avait 4 blocs de 24 parcelles, soit 96 parcelles combinant 4 densités de semis : 50, 75, 100 et 125 kg de grain à l'hectare et 6 types de fertilisation azotée.

Fertilisation azotée (kg N/ha).

Tallage	Début montaison	Total
40	0	40
40	30	70
40	60	100
70	0	70
70	30	100
70	60	130

III. — RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le tableau ci-dessous nous indique pour chaque densité de semis le nombre moyen de plantes à la sortie de l'hiver, le nombre d'épis au m^2 à la récolte (moyenne de toutes les parcelles ayant une même densité de semis, quelle que soit la fertilisation azotée).

Densité des semis (kg de grain/ha)	125	100	75	50
Nombre de pieds au m^2	146	124	92	59
Nombre d'épis au m^2	438	385	342	282
Coefficient de tallage	3	3,1	3,7	4,8

[1] Nous remercions vivement ici Messieurs POULLAIN, directeur du Centre d'Études Techniques Agricoles du Mantais, et APPENZELLER, grâce à qui cette expérience a pu être réalisée.

La densité de plantes étant proportionnelle à la densité de semis nous parlerons donc indifféremment de densité de plantes ou de densité de semis.

Plus la densité de plantes est faible, plus le tallage est important, ce qui est bien connu.

Le tableau suivant nous montre comment agit la fertilisation azotée.

Densité d'épis au m² (moyenne des 4 blocs).

Densité de semis → / Quantités d'azote ↓	125	100	75	50
40	390	374	327	280
40 + 30	452	375	350	279
40 + 60	434	386	359	287
70	421	382	334	272
70 + 30	452	397	345	279
70 + 60	479	405	349	290

On constate que, plus la densité de plantes est forte, plus la fertilisation a d'action sur la densité d'épis : à la densité de semis de 50 kg de grain à l'hectare, le tallage est approximativement le même, quelle que soit la dose d'azote appliquée et le mode d'application ; la variation du tallage est faible pour 75 et même 100 kg de grain à l'hectare, elle est nettement plus forte pour 125 kg.

L'explication nous semble simple : lorsqu'il y a une faible densité de plantes (50 kg de grains à l'hectare), une petite quantité d'azote suffit à amener la teneur en azote de la plante à une valeur au-dessus de laquelle elle n'a plus d'action sur la croissance et en particulier sur le tallage.

Pour une densité de plantes nettement plus forte, cette même quantité d'azote, répartie dans un plus grand nombre de plantes, ne permet pas d'atteindre cette concentration limite (tout au moins durant un certain laps de temps) et une quantité d'azote plus grande permet alors une croissance et en particulier un tallage supplémentaire.

L'examen des chiffres de la colonne de gauche du tableau nous montre que l'azote mis au début de la montaison influe remarquablement sur la densité d'épis. La montaison est la phase de végétation où la croissance est la plus active et un manque d'azote pendant cette phase peut empêcher certains talles de se développer normalement.

L'examen des rendements nous montre que la variation des rendements en fonction de la fertilisation azotée est d'autant plus forte que la densité de plantes est plus forte (comparer par exemple les différences entre rendement maximum et minimum : de droite à gauche elles sont : 5, 7, 8, 9 ; ou encore les différences de rendement entre la première et la dernière colonne qui sont plus grandes lorsque la fertilisation azotée devient plus forte.

Rendements en grain (quintaux a l'hectare).

Densité de semis → / Quantités d'azote ↓	125	100	75	50
40	52	52	49	46
40 + 30	59	58	51	49
40 + 60	61	60	54	50
70	57	57	53	49
70 + 30	61	59	56	51
70 + 60	60	59	52	49

Si on exprime le rendement à l'hectare en un produit des trois composantes : nombre d'épis à l'hectare × nombre moyen de grains par épi × poids moyen d'un grain, on constate que les différences de fertilisations azotées ont agi sur les deux dernières composantes du rendement même dans le cas (on peut même dire : plus particulièrement dans le cas) où elles n'ont pas agi sur la première composante (cas de la faible densité de plantes).

Ces résultats nous confirment qu'il existe une concentration en azote limite au-dessus de laquelle il n'y a plus d'augmentation de la croissance. Pour de très fortes concentrations, il pourrait même y avoir diminution de la croissance.

Lorsque l'agriculteur apportait uniquement au tallage la plus grande quantité d'azote compatible avec le manque de verse, on peut penser que : pendant la première phase de la croissance active (tallage, début montaison) le blé avait une teneur en azote trop élevée, puis, par suite de la croissance, la teneur en azote diminuait, devenait optimum, puis pouvait devenir inférieure à l'optimum.

Si nous considérons les rendements obtenus avec la densité de semis 125 kg/ha, nous constatons que 70 kg d'azote au tallage donnent un rendement supérieur à 40 kg d'azote au tallage. Dans une expérience de fertilisation azotée ne comportant que des apports au tallage, on sera,

dans le cas envisagé, amené à dire que les 30 kg apportés en sus des 40 kg constituent un « besoin » . Or, 40 kg au tallage, plus 30 kg à la montaison, donnent un résultat supérieur à 70 kg (donc le fractionnement est avantageux) et surtout 40 + 60 donne le meilleur rendement analogue d'ailleurs à 70 + 30. Cette expérience nous fait bien sentir que le problème consiste à chercher la fertilisation azotée optimum du tallage *dans un système où l'on apporte des fertilisations plus tardives* et de chercher quelle doit être l'importance de ces fertilisations tardives. Il est possible que la fertilisation optimum dans l'expérience exposée ici ait été : 60 kg d'azote au tallage, 40 kg au début de la montaison et 20 kg à l'épiaison.

CONCLUSIONS

De la discussion précédente, nous pouvons tirer quelques conclusions.

1° L'agriculteur ne peut, par une forte fertilisation azotée, obtenir une densité d'épis suffisamment forte à partir d'une faible densité de plantes.

2° Il ne peut, non plus, espérer par une très forte densité de plantes (qui n'a pas été essayée dans cette expérience) obtenir *à la fois* une densité d'épis moyenne convenable et une concentration en azote optimum de la partie végétative ; car il faudrait que la plante soit déficiente en azote pour qu'il n'y ait qu'un certain nombre de talles à monter dans le cas de forte densité de plantes.

3° Il faut donc une densité de plantes moyenne (à déterminer en fonction d'un certain nombre de facteurs, tels que la variété, le milieu) qui permette ensuite de conduire par la nutrition azotée la croissance et le fonctionnement du blé de façon à obtenir, dans le milieu donné, le maximum de rendement et de qualité du grain.

4° L'agriculteur doit savoir que pour l'obtention du nombre optimum d'épis au m² (1re composante du rendement), non seulement influe l'*azote apporté au tallage, mais aussi celui présent au début de la montaison* (que celui-ci provienne de la nitrification de la matière organique azotée du sol ou des engrais azotés). Comme l'azote présent à cette époque aura une forte répercussion sur la 2e composante du rendement (nombre moyen de grains par épi), on comprend qu'il soit particulièrement important d'assurer une bonne nutrition azotée pendant la montaison après avoir apporté au tallage une fertilisation azotée suffisante mais pas excessive.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Coïc (Y.), Coppenet (M.) et Helias (M.). — Influence de l'époque d'apport des engrais azotés sur les composantes du rendement en blé. *C. R. Ac. Agric.*, p. 231-234, 1950.

(2) Coïc (Y.). — La nutrition et la fertilisation azotées du blé d'hiver. I. Les besoins en azote du blé d'hiver. Conséquences agronomiques. *Annales Agronomiques* n° 1, p. 115-131, 1956.

RÉSUMÉ

Les résultats expérimentaux montrent que :

1° Plus la densité de plantes est élevée, plus la fertilisation azotée a d'action sur la densité d'épis. L'explication en est simple : lorsque la densité de plantes est faible, une petite quantité d'azote suffit à amener la teneur en azote de la plante à une valeur au-dessus de laquelle elle n'a plus d'action sur la croissance et en particulier sur le tallage. Pour une densité de plantes plus forte, cette même quantité d'azote ne permet pas d'atteindre cette concentration limite et une quantité d'azote plus grande permet alors une croissance et en particulier un tallage supplémentaires.

2° L'azote mis au début de la montaison influe remarquablement sur la densité d'épis.

3° Les différences de fertilisation azotée se traduisent par des différences sur le produit des deux dernières composantes du rendement (nombre moyen de grains par épi × poids moyen d'un grain) surtout lorsqu'elles n'ont pas agi sur la première (nombre moyen d'épis à l'unité de surface). On comprend alors mieux le processus de l'utilisation du gros et unique apport d'azote fait autrefois au tallage.

4° En conclusion, le cultivateur ne peut remédier à une faible densité deplantes par une forte fertilisation azotée. Il ne peut non plus obtenir une densité d'épis convenable par une très forte densité de plantes sans créer une déficience en azote néfaste. Une densité de plantes moyenne, une fertilisation azotée « au tallage » non « excessive », suivie d'une bonne nutrition azotée ultérieure peut conduire à une combinaison judicieuse des trois composantes du rendement et, en définitive, à un gros rendement en grain de bonne composition.

ÉTUDE DE QUELQUES DÉVIATIONS DU MÉTABOLISME CHEZ LES PLANTES ATTEINTES DE MALADIES A VIRUS *(suite)*

PAR

C. MARTIN

Stations centrales de Pathologie végétale et de Physiologie végétale,
C. N. R. A., Versailles.

PLAN DU MÉMOIRE

VI. — MISE EN ÉVIDENCE ET IDENTIFICATION DES SUBSTRATS DE LA POLYPHENOL-OXYDASE

Après avoir mis en évidence, au cours de l'étude de l'activité de la polyphénol-oxydase, l'absorption anormale d'oxygène que nous venons de décrire, nous en avons recherché l'origine. Elle peut être due : — soit à une oxydation directe d'un substrat et dans ce cas, étant donné la spécificité des enzymes, il ne pouvait s'agir que de composés phénoliques ; — soit à des oxydations couplées qui, elles, peuvent porter sur des composés très variés. Nous avons donc tout d'abord recherché s'il ne s'agissait pas de composés phénoliques.

I. — MISE EN ÉVIDENCE DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES.

1° Technique d'extraction

Différents auteurs ont récemment étudié la composition en phénols de plantes par chromatographie sur papier. Citons, parmi les travaux les plus importants, ceux de ROBERTS et WOOD (1951) (25), qui ont étudié la composition en polyphénols des feuilles de thé d'une part, et des feuilles de Tabac fermentées d'autre part. Dans ce dernier cas, les auteurs broient leurs tissus dans l'eau, font bouillir la solution ainsi obtenue pendant quelques minutes et centrifugent. C'est cette solution qu'ils chromatographient à 2 dimensions sur du papier Whatmann n° 1 :

— le 1er solvant étant le phénol saturé d'eau,
— le 2e le Butanol-Acide acétique-Eau.

Ils révèlent leurs chromatogrammes par exposition aux vapeurs d'ammoniaque et pulvérisation d'alun ferrique à 0,2 p. 100 ou de nitrite de sodium en présence de soude (10 p. 100).

Ils concluent de leurs essais que c'est l'acide chlorogénique et la rutine qui sont les phénols les plus abondants chez le Tabac, au moment de la récolte. Ils ne peuvent détecter ni d'acide caféique libre ni de tannins.

L'acide chlorogénique fut retrouvé, en 1955, par M. SHIROYA et S. HATTORI (27) dans les extraits de feuilles de *Dahlia variabilis* et dans les extraits de feuilles de Tabac (*Nicotiana Tabacum*, var. White Burley).

C'est la technique de ROBERTS et WOOD (25) que nous avons employée et modifiée comme suit : les feuilles de plantes à étudier, correspondant à un poids sec déterminé, sont broyées à froid dans l'alcool méthylique ou éthylique, afin d'éviter le plus possible les oxydations enzymatiques ; dans le cas où il se produit un brunissement du jus par oxydation au contact de l'air, on peut l'arrêter par adjonction de bisulfite de sodium à 1 p. 1 000. On filtre, on amène ensuite ces jus à sec par évaporation sous vide à 40°C et on reprend l'extrait sec par un volume connu d'alcool ou d'eau de manière à pouvoir comparer entre eux les différents extraits. Pour le Tabac et la Pomme de terre, 15 g. de tissu. frais correspondant à 1,5 g environ de poids sec, sont nécessaires pour cet essai. Pour le Dahlia, 5 g de feuilles, soit un poids sec d'environ 0,5 g sont suffisants. Les extraits secs sont alors repris par 2 ml d'eau distillée.

2° Chromatographie des extraits.

Les solutions obtenues sont ensuite chromatographiées sur du papier Whatman n° 1 ou n° 4, en chromatographie descendante. Le principal travail a été de déterminer un mélange de solvants donnant de bonnes

séparations des phénols en chromatographie unidimensionnelle ; pour cela, les mélanges suivants ont été essayés :

Benzène-Acide acétique-Eau : 2/2/1 (BRAY, 1950) (8)
Butanol-Eau (Butanol saturé d'eau) (KELEMEN, 1950) (19)
Butanol-Ethanol-Eau : 40/10/20
Benzène-Acide acétique : 1 p. 100
Butanol-Acide acétique-Eau : 40/10/50 (BATE-SMITH, 1949) (4)

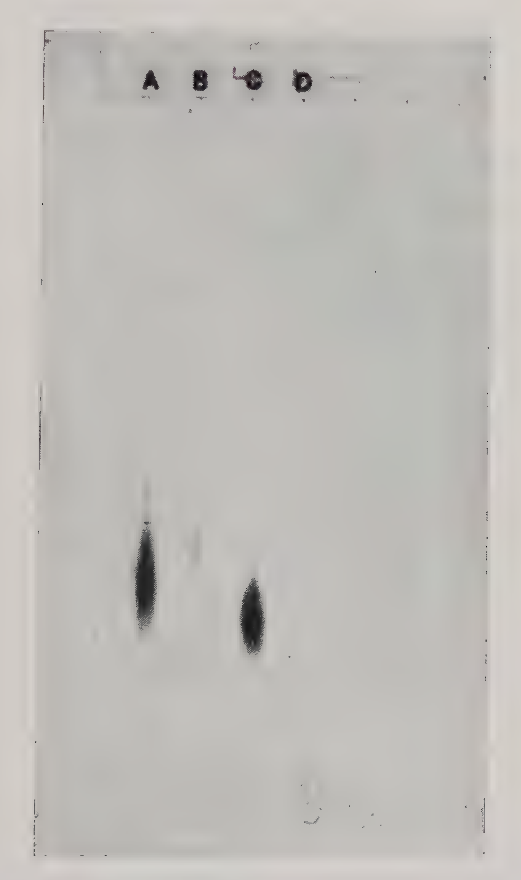


FIG. 9. — Chromatographie d'extraits de Pomme de terre dans le mélange classique Butanol-Acide acétique-Eau 40-10-50. A = plante malade (virus Y). B = plante saine. C = acide chlorogénique pur.

Aucun de ces mélanges ne donne de séparations convenables. Le meilleur semble être le mélange Butanol-Acide acétique-Eau 40/10/50, mais la séparation n'est pas encore parfaite avec ce solvant. Pour tenter d'améliorer les séparations, les feuilles de papier furent tamponnées, par trempage dans différents tampons. Les tampons étudiés par MCFARREN en 1951 (10) pour la séparation des acides aminés ont été utilisés

pour cet essai et finalement c'est le tampon phosphate 0,067 M, pH = 7,5, qui a donné les meilleurs résultats. La phase solvante est constituée de :

Butanol-Tampon-Acide acétique 150/50/5.

On obtient de cette manière, à partir d'extraits de Tabac et de Pomme de terre, de bonnes séparations des phénols par chromatographie

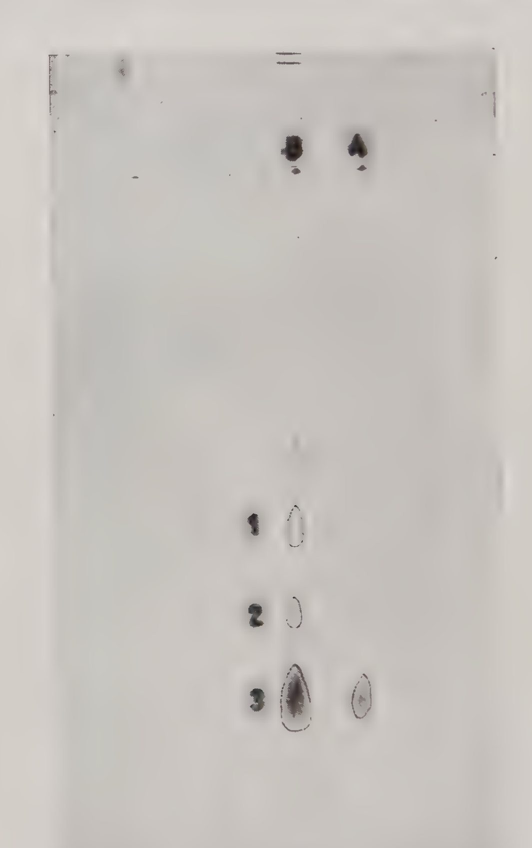


Fig. 10. — Chromatographie des mêmes extraits que ceux de la figure n° 9 sur papier tamponné à pH 7,5. A = plante saine. B. = plante malade.

à une seule dimension. Les figures 9 et 10 montrent des chromatographies d'extraits de Pomme de terre réalisés par cette technique et par la technique classique utilisant comme solvant le mélange Butanol-Acide acétique-Eau 40/10/50. On voit que, dans ce second solvant, il n'y a absolument pas de séparation des taches obtenues par révélation au nitrate d'argent, alors que l'emploi de tampon fait apparaître trois taches nettement distinctes.

3° Révélation des chromatogrammes.

Les chromatogrammes séchés sont d'abord examinés en lumière ultra-violette ; de nombreux phénols des plantes présentent, en effet, une fluorescence verte et il est alors facile de localiser les taches. Les chromatogrammes sont ensuite révélés avec différents réactifs des phénols.

Il existe peu de corps réagissant uniquement avec les phénols, c'est pourquoi il est nécessaire d'utiliser plusieurs réactifs permettant de faire des recoupements. Les réactifs suivants ont été utilisés :

1° Les sels de diazonium.

Les sels de diazonium réagissent spécifiquement sur les phénols en milieu alcalin en donnant des produits colorés. Ils se décomposent rapidement à la température ordinaire et doivent être préparés immédiatement avant l'emploi. On utilise généralement, en raison de leur stabilité un peu plus grande, ceux que l'on obtient en diazotant l'acide sulfanilique ou la para nitraniline ; on les prépare de la manière suivante :

Pour l'acide sulfanilique (Block, 1955 (6) ; Hossfeld, 1951) (18) on mélange à volume égal une solution d'acide sulfanilique (1 g d'acide sulfanilique, 8 ml d'acide chlorhydrique concentré, 100 ml d'eau) avec une solution de nitrite de sodium à 0,69 p. 100. On pulvérise le chromatogramme une première fois avec cette solution, puis une deuxième fois avec une solution de carbonate de sodium à 10 p. 100. Les taches représentant les composés phénoliques apparaissent en jaune orangé.

La p. nitraniline diazotée est préparée (Bray, 1950) (8) en mélangeant 25 ml d'une solution de p. nitraniline à 0,3 p. 100 dans l'acide chlorhydrique à 80 p. 100 avec 1,5 ml d'une solution de nitrite de sodium à 5 p. 100. On pulvérise le chromatogramme avec cette solution, puis avec une solution de carbonate de sodium à 20 p. 100.

2° Le chlorure ferrique.

La plupart des phénols donnent avec le chlorure ferrique en milieu neutre ou légèrement acide des colorations rouges, violettes, vertes ou brunes dues à la formation de complexes avec l'ion Fe^{+++} ; ces réactions sont très souvent utilisées pour la recherche des phénols. Le réactif est employé en solution aqueuse à 0,1 p. 100. Il a le défaut d'être peu sensible.

3° Le nitrate d'argent ammoniacal, 0,1 N.

C'est un réactif beaucoup moins spécifique que les premiers, puisque toutes les substances aisément oxydables ont la propriété de le réduire ; il est cependant très utilisé à cause de sa grande sensibilité ; les composés

phénoliques apparaissent en noir sur le fond blanc du papier après pulvérisation du réactif. Il est aisé de conserver ces chromatogrammes très spectaculaires en les fixant par trempage dans une solution d'hyposulfite. Tous les chromatogrammes photographiés dans ce mémoire ont été traités de cette façon.

4° Résultats.

1° Tabac.

Les chromatogrammes (fig. n° 11) obtenus de la façon que nous venons de décrire, à partir d'extraits de Tabac, montrent trois taches prin-



FIG. 11. — Accumulation de phénols chez le *Nicotiana Tabacum* : A = plante saine. B = plante malade (le virus étant la Mosaïque du Tabac).

cipales avec les différents réactifs utilisés. Il s'agit de phénols donnant une coloration verte avec le chlorure ferrique, jaune orangé avec l'acide sulfanilique diazoté ; ils présentent une fluorescence verdâtre par examen en lumière ultra-violette. Ils ont été numérotés 1, 2, 3, sur les chromatogrammes et les photographies montrent que c'est le phénol n° 3, qui est



FIG. 12. — Accumulation de phénols chez la Pomme de terre (feuilles).
A = plante saine. B = plante malade (virus Y).

de beaucoup le plus abondant ; viennent ensuite, dans l'ordre, les phénols n° 2 et n° 1.

Ces taches sont beaucoup plus intenses chez les plantes atteintes de mosaïque que chez les plantes saines. Mais la différence entre plante saine et plante malade n'est pas toujours aussi nette ; elle est maximum lorsqu'on travaille avec des plantes jeunes, au printemps ou en été, c'est-à-dire en jours longs, et lorsque les plantes malades présentent leurs symp-

tômes. Mais il n'y a plus de différence lorsque les plantes sont âgées et près de leur époque de floraison. De même, en hiver, sous faible intensité lumineuse, les plantes malades jeunes présentent certes des taches plus intenses que les plantes saines, mais la différence est beaucoup plus faible qu'en été.

2° Pomme de terre.

Les chromatographies réalisées à partir d'extraits de feuilles (fig. 12) montrent également un accroissement de la quantité de phénols



Fig. 13. — Accumulation de phénols chez la Pomme de terre (germes). A = plante saine. B = plante malade (virus Y). C = Acide chlorogénique pur (extrait de café). E = Acide caféique.

chez les plantes malades, mais le nombre de taches est tel qu'il n'est guère possible d'obtenir de bonnes séparations. Il est préférable d'étudier

l'accumulation de ces substances dans les germes de Pomme de terre, organes dans lesquels la photosynthèse joue un rôle négligeable et où le nombre des composés phénoliques est beaucoup moins important ; ces germes sont obtenus de la même façon que ceux qui servent à étudier l'activité enzymatique, à savoir : croissance à l'obscurité jusqu'à obtention de germes ayant de 3 à 4 cm de longueur, puis exposition de ces germes à la lumière pendant 72 h. On obtient, dans ces conditions, comme nous le verrons dans un chapitre ultérieur, une bonne multiplication du virus pendant l'exposition à la lumière, alors que cette multiplication est faible à l'obscurité. On retrouve alors les trois mêmes taches que chez le Tabac quoique, chez les plantes saines, les deux taches supérieures, qui sont beaucoup moins intenses tant chez les plantes saines que chez les plantes malades, n'apparaissent pas toujours aux concentrations auxquelles nous travaillons.

II. — IDENTIFICATION DES PHÉNOLS

1° Tabac.

1° Acide chlorogénique.

Après avoir mis en évidence l'accumulation de phénols chez les plantes malades, il était nécessaire d'isoler ces corps en vue de les identifier ; cette extraction a été laborieuse en raison de leur concentration extrêmement faible dans les organes végétaux étudiés. Pour cela, nous avons employé la technique suivante :

2 kg de feuilles sont broyés dans du méthanol et le jus obtenu est filtré après passage à travers une étamine afin d'éliminer les débris cellulaires. Le jus est amené à sec par distillation sous vide à 40° C, puis est repris dans 20 ml de méthanol. Cette solution est alors déposée en bande continue sur du papier Whatmann n° 3, tamponné à pH 7,5 et chromatographiée dans le mélange Butanol-Tampon pH 7,5-Acide acétique 150-50-5. Après développement et séchage, le chromatogramme est examiné sous lumière ultra-violette, ce qui permet de repérer l'emplacement des phénols grâce à leur fluorescence verte. Pour plus de sûreté on découpe sur l'un des côtés du chromatogramme, une bande que l'on révèle au nitrate d'argent. Les bandes correspondant aux phénols sont alors découpées et éluées par de l'alcool éthylique. Après concentration, le liquide obtenu est à nouveau déposé de la même façon sur du papier Whatmann n° 3, non tamponné et chromatographié avec, comme solvant, le mélange Butanol-Ethanol-Eau 40-10-20. La bande correspondante au phénol est éluée comme précédemment et on procède à une troisième chromatographie avec, comme solvant, l'Acide acétique à 2 p. 100. En employant, au

départ, 5 à 6 feuilles de papier Whatmann n° 3, il est facile d'obtenir avec le phénol n° 3 de 15 à 20 mg d'un corps qui cristallise en fines aiguilles rassemblées en mâcles, ayant la forme d'oursins et fondant à 208° C. Ce corps, facilement soluble dans l'alcool et l'acétone, est pratiquement insoluble dans l'éther et le chloroforme ; ses solutions se colorent en vert en présence de $FeCl_3$, ce qui semble indiquer que nous avons affaire à un ortho-diphénol. Il donne, en présence de nitrite de sodium et de soude, une coloration rose caractéristique de l'acide cafféique (HOEPFNER, 1932) (17). Or, on sait, depuis FREUDENBERG (1920) (14) que, chez les plantes, l'acide cafféique existe généralement en combinaison avec l'acide quinique pour former un depside : l'acide chlorogénique.

Or, le point de fusion de l'acide chlorogénique (208°C), correspond au corps que nous avons isolé.

D'autre part, l'acide chlorogénique a été signalé dans le Tabac en 1951, par ROBERTS et WOOD (26).

O
H H ‖ OH
— C = C — C — O
C = O
HO OH
OH OH
OH

La synthèse de l'acide chlorogénique n'est pas réalisable pratiquement ; par contre, les grains verts de café, où il forme un complexe avec la caféine, en renferment de grandes quantités, puisque la concentration dans ce matériel peut atteindre 3 p. 100. C'est donc à ce matériel que nous nous sommes adressés pour préparer un échantillon pur destiné à vérifier notre identification. L'acide chlorogénique du café fut isolé suivant la technique de GORTER (1909) (16) : les grains verts de café, broyés, sont extraits à l'eau froide en présence de toluène. L'extrait, concentré sous vide, est traité par l'alcool absolu de façon à obtenir une solution alcoolique à 50 p. 100. Le précipité qui se forme est filtré et redissous dans un minimum d'alcool à 50 p. 100, traité au charbon et cristallisé. Pour séparer la caféine du complexe, on redissout les cristaux dans un peu d'eau chaude et on extrait la caféine au chloroforme. La solution aqueuse est alors acidifiée avec de l'acide sulfurique ; l'acide chlorogénique pur précipite. On le recristallise dans l'eau. Le rendement est de l'ordre de 1 p. 100.

L'acide chlorogénique, ainsi isolé, se présente sous un aspect semblable au composé n° 3 du Tabac. Le point de fusion est identique : 208°C ; il ne varie pas lorsque l'on mélange les deux composés. Le R_F sur papier Whatmann n° 4 est identique : 0,52, dans le mélange Butanol-Acide acétique-

Eau 40-10-50 ; les deux corps mélangés ne donnent qu'une tache. D'autre part, les spectres d'absorption déterminés au spectrophotomètre Beckmann sont semblables (voir courbe, fig. 14). Il ne fait donc aucun doute que le phénol n° 3 est bien l'acide chlorogénique.

Ce corps est d'ailleurs très répandu dans le règne végétal puisque, en dehors du Café et du Tabac, on le retrouve chez le *Pinus laricio*, le *Larix europaea*, le *Papaver somniferum*, le *Digitalis purpurea*, le *Dahlia variabilis*. Il fut isolé pour la première fois par GORTER (16) sous forme de complexe cristallin, caféine-chlorogenate de potassium, duquel il sépare

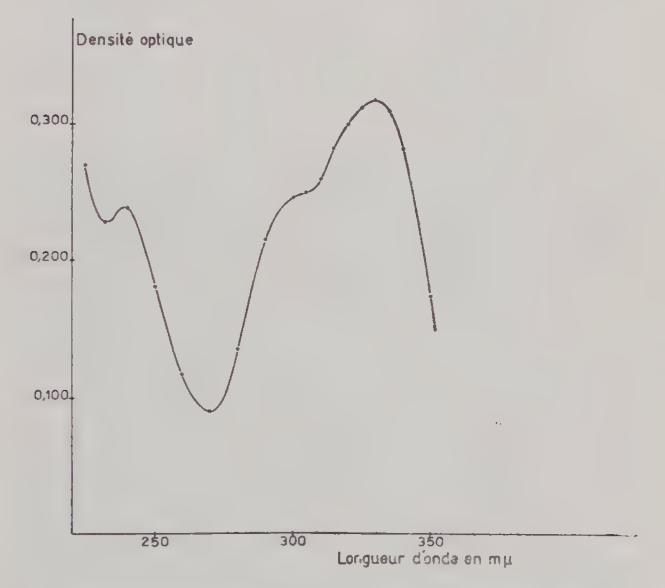


FIG. 14. — Spectre d'absorption U. V. de l'Acide chlorogénique isolé de Tabac.

l'acide pur. La structure proposée par GORTER fur discutée en 1920 par FREUDENBERG (14), qui proposa alors une autre structure, qui fut définitivement reconnue, en 1932, par FISCHER et DANGSHAT (12). Elle correspond à la formule que nous avons donnée plus haut.

2° Acide isochlorogénique.

Le corps numéroté « 2 » sur les chromatogrammes fut isolé de la même façon que l'acide chlorogénique, c'est-à-dire par chromatographie dans différents solvants sur papier Whatmann épais n° 3. Mais les différents essais ayant pour but d'obtenir des cristaux ont échoué. Or, des travaux récents dus à BARNES et coll. (1950) (3) ont révélé la présence d'isomères de l'acide chlorogénique dans les extraits de café. Le plus important de ces isomères a été appelé acide isochlorogénique. C'est un isomère

de position par rapport à l'acide chlorogénique ; ce dernier, en effet, est constitué d'acide cafféique estérifié par l'hydroxyle en position 3 de l'acide quinique ; pour l'acide isochlorogénique, ce serait l'hydroxyle qui se trouve en position 5 qui interviendrait :

Fischer avait d'ailleurs établi, comme preuve de la structure qu'il proposait, pour l'acide chlorogénique, qu'une lactone ne pouvait se former puisque les hydroxyles 4 et 5 étaient en position trans par rapport au carboxyl. Il n'en est pas de même pour l'acide isochlorogénique où une lactonisation est possible ; elle a été démontrée par Barnes H. M. et coll. en 1950 (3). Ces auteurs attribuent d'ailleurs l'impossibilité d'obtenir une forme cristalline de l'acide isochlorogénique au fait qu'on a toujours affaire à un mélange acide-lactone.

Dans le but de voir s'il s'agissait d'acide isochlorogénique, le phénol n°2, en solution aqueuse, fut donc hydrolysé suivant la technique de Barnes par de la soude normale, sous atmosphère d'azote et à la température du laboratoire. On laisse l'hydrolyse se poursuivre toute une nuit, après quoi on acidifie avec une quantité équivalente d'acide sulfurique. L'acide cafféique est isolé du produit de saponification par extraction continue à l'éther. Le produit d'extraction à l'éther fut chromatographié sur du papier Whatmann n° 1 avec, comme témoin, de l'acide cafféique pur. Différents solvants furent employés : Butanol-Acide acétique-Eau 40-10-50 ; Butanol-Ethanol-Eau 40-10-20. L'acide cafféique fut révélé par le nitrate d'argent. Cette étude nous a permis de mettre en évidence la présence d'acide cafféique dans l'hydrolysat du phénol n° 2. Puis le liquide de saponification, après extraction à l'éther, est amené à sec et repris par l'acétone. Cette solution acétonique est chromatographiée avec, comme témoin, de l'acide quinique. Après développement, les chromatogrammes sont révélés par le réactif de Cifonelli et Smith (Feigl, « Spot test », t. 2, p. 262) (11). La méthode consiste à pulvériser sur le chromatogramme :

1 — une solution concentrée de métapériodate de sodium que l'on a étendue de 2 volumes d'eau. On attend 20 minutes et on pulvérise.

2 — une solution composée de :

Nitroprussiate de sodium	50 mg
Piperazine	50 mg
H_2O	2 ml
Alcool éthylique	10 ml

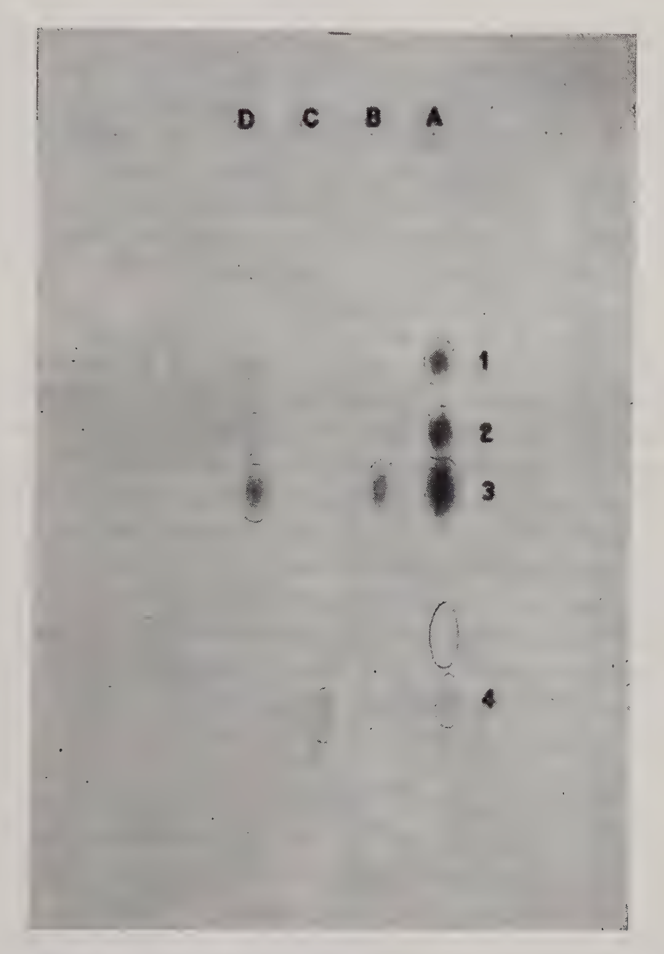


Fig. 15. — Chromatographies comparées d'extraits de Tabac et de Café. A = Extraits de plantes malades (M. T.). B = Acide chlorogénique pur (extrait de café). C = Rutine pure. D = Extrait de Café (extraction méthylique).

On révèle 10 min. à 100°C. L'acide quinique donne alors une tache orangée avec une marge verte. Cet acide quinique fut retrouvé dans l'hydrolysat du phénol n°2.

Cependant, la chromatographie sur papier tamponné permettant d'obtenir des taches bien séparées, un extrait par l'alcool méthylique de grains verts de café fut chromatographié à côté d'un extrait de Tabac, afin d'apporter une preuve supplémentaire à notre identification. La photographie du chromatogramme (fig. 15) montre qu'il y a identité entre

les trois phénols rencontrés chez le Tabac et ceux du café. Il y a donc de grandes chances pour que le phénol n° 2 soit l'acide isochlorogénique de Barnes (3).

3° Composé n° 1.

Ce phénol fut isolé et traité de la même façon que l'acide isochlorogénique, ce qui permit de mettre en évidence l'acide cafféique. Mais l'acide quinique n'a pu être retrouvé. Les trop faibles quantités de ce corps, chez le Tabac, n'ont pas permis de pousser plus loin les investigations. Signalons cependant que ce corps semble identique à un phénol du café comme le montre la figure 13. Il s'agit vraisemblablement d'un corps qui a la même constitution que les corps précédents avec une structure différente.

2° Pomme de terre.

Chez cette plante, le nombre des composés phénoliques dans les feuilles est tel qu'il n'est pas possible de les isoler aisément ; par contre, dans les germes, il est beaucoup plus réduit puisqu'ils ne sont que trois. Des chromatographies comparées d'extraits de germes de Pomme de terre, de feuilles de Tabac et de grains verts de Café ont permis de montrer l'identité de ces corps avec les acides chlorogénique et isochlorogénique et le composé n° 1, étudiés chez le Tabac.

D'autre part, au cours des extractions d'acide chlorogénique et isochlorogénique chez la Pomme de terre, nous avons séparé, purifié et cristallisé une autre substance phénolique : la rutine. C'est un rahmno glucoside de la quercetine. Sa formule est la suivante :

On retrouve cette rutine chez le Tabac, le Dahlia et l'Hortensia ; mais il est important de signaler qu'on ne trouve ce corps que chez les plantes âgées, près de la floraison ou en pleine floraison. Il n'est pas possible de dire s'il y a accumulation de ce composé chez les plantes malades ;

en effet, chez une plante âgée, en fleurs, il n'existe plus de différence dans le contenu en phénols entre plantes saines et plantes malades.

3° Dahlia.

Quelques chromatographies réalisées avec des extraits de feuilles de plantes saines et de plantes malades ont permis de mettre en évidence l'accumulation d'acide chlorogénique chez les plantes hébergeant le virus de la Mosaïque du Dahlia. D'autres phénols, dont la nature n'a pas été étudiée, s'accumulent également chez les plantes malades.

III. ESSAI DE DOSAGE DE L'ACIDE CHLOROGÉNIQUE

1° Recherche d'une méthode de dosage.

Pour pouvoir comparer la teneur en phénols des plantes saines et des plantes malades, et étudier leurs variations, il fallait une méthode de dosage très sensible, permettant de déterminer d'une manière quantitative très précise les faibles quantités d'acide chlorogénique contenues dans les organes des plantes étudiées.

Nous avons tout d'abord songé à utiliser la fluorescence et avons tenté de faire des essais qui, basés sur cette fluorescence et réalisés grâce au dispositif spécial de spectrophotométrie de Beckmann, n'ont pas donné de résultats satisfaisants. Cette méthode, qui donne de bons résultats avec des substances à très forte fluorescence, comme la scopolétine, ne permet pas le dosage de l'acide chlorogénique, dont la fluorescence est plusieurs milliers de fois plus faible.

Puis plusieurs réactions colorimétriques furent essayées :

— dosage colorimétrique du diazoïque de l'acide chlorogénique obtenu par action du sel de diazonium de l'acide sulfanilique en milieu alcalin ;

— dosage du produit coloré obtenu par action du nitrite de sodium en milieu alcalin (HOEPFNER, 1932) (17) :

— évaluation de la coloration violette obtenue par action de l'acide chlorhydrique à l'ébullition.

Mais aucune de ces méthodes n'est suffisamment sensible, puisque la limite inférieure de dosage est de l'ordre de 200 γ/ml.

Nous avons alors essayé d'utiliser les propriétés réductrices de ces phénols et nous nous sommes adressés à certaines microméthodes de dosage des sucres. C'est la méthode de PARK et JOHNSON (1949) (23), micro-modification de la méthode de FOLIN et MALMROS (1929) (13) qui donne les meilleurs résultats. Voici en quoi elle consiste :

— On amène la solution à analyser à un volume connu de 1 ou 2 ml.

— On y ajoute :

a) 1 ml d'un mélange carbonate-cyanure : 5,3 g CO_3Na_2 ; 0,65 g KCN ; 1 litre d'eau distillée ;

b) 1 ml d'une solution de $Fe(CN)_6K_3$ à 0,5 g/l.

— On mélange et on chauffe au bain-marie bouillant 15 minutes.

— On refroidit ensuite et on ajoute 5 ml d'une solution de sulfate ferrique constituée comme suit : 1 g $(SO_4)_3Fe_2$; 50 ml SO_4H_2N ; 1 g de Duponol.

On détermine ensuite l'absorption au photocolorimètre à 690 mμ.

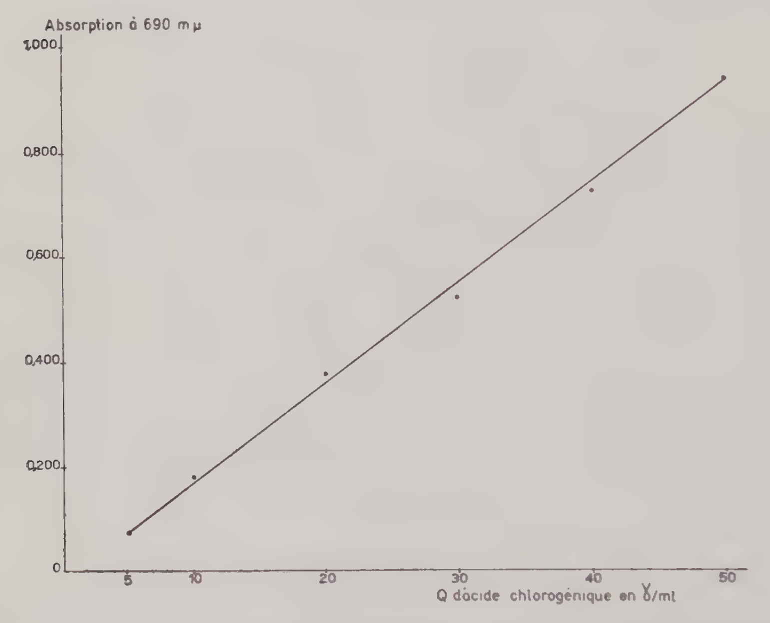


Fig. 16. — Courbe de dosage de l'acide chlorogénique par la méthode de Park et Johnson (23).

Cette technique donne de très bons résultats, comme le montre la courbe étalon établie à partir d'acide chlorogénique pur (fig. 16) et est valable entre 5 et 100 γ/ml.

2° Résultats.

Nous avons tout d'abord effectué quelques dosages dans des feuilles de Tabac, var. Samson, sains et atteints de la Mosaïque. Ces premiers dosages nous ont montré que les teneurs en acide chlorogénique varient énormément suivant la saison, l'âge et l'état physiologique de la plante. Dans chaque expérience, les plantes malades renferment toujours plus d'acide chlorogénique que les plantes saines mais les valeurs absolues peuvent varier du simple au double, suivant les conditions extérieures.

Quelques-uns des résultats sont consignés dans le tableau suivant (nº XI).

TABLEAU XI

Teneur en acide chlorogénique du Nicotiana Tabacum à différentes époques de l'année.

	Dosage du 5. 2. 1957	Plante saine Plante malade	160 mg d'Acide chlorogénique/kg. poids frais 198 mg d'Acide chlorogénique/kg. poids frais
Forte luminosité	Dosage du 17. 4. 57.	Plante saine Plante malade	182 mg d'Acide chlorogénique/kg. poids frais 298 mg d'Acide chlorogénique/kg. poids frais
Faible luminosité	Dosage du 15. 4. 57	Plante saine Plante malade	151 mg d'Acide chlorogénique/kg. poids frais 202 mg d'Acide chlorogénique/kg. poids frais

Aussi, pour se mettre à l'abri de ces variations, d'autres dosages, plus nombreux, ont été réalisés sur germes de Pomme de terre ayant poussé

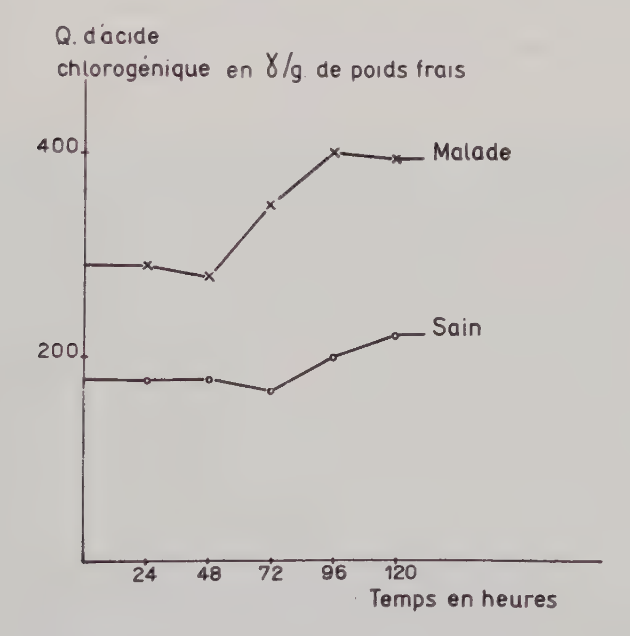


FIG. 17. — Évolution de la quantité d'Acide chlorogénique dans les germes de Pommes de terre saines et malades (virus Y).

dans des conditions déterminées et constantes. Voici quelles étaient ces conditions : on laisse pousser les germes à l'obscurité complète, à 20ºC, jusqu'à ce qu'ils aient de 3 à 4 cm de longueur et, à partir de ce moment, on les éclaire grâce à 2 tubes fluorescents de 40 watts (2 000 Lux) (type Phytorel) par m² ; on ne change aucun autre facteur que la lumière et ce genre d'expérience peut être facilement renouvelé ; en effet, des tubercules de Pomme de terre, même en nombre important, occupent un faible

volume ; il est donc facile de réaliser la chambre noire et d'y contrôler la température, l'humidité, la lumière, etc... La variété de Pomme de terre servant à cette étude était la Bintje. Les plantes malades étaient atteintes de virus Y.

TABLEAU XII

Évolution de la quantité d'Acide chlorogénique en fonction du temps dans les germes de Pommes de terre saines et malades (virus Y).

Temps en h.	Q. d'acide chlorogénique en γ/g de poids frais		Q. de virus	Poids sec en % du poids frais	
	Sain	Malade		Sain	Malade
0	178	290	1/32	8,58	9,80
24	180	290	1/64	8,92	10,14
48	180	280	1/128	9,55	10,78
72	170	370	1/128	8,99	10,12
96	200	405	1/128	8,93	10,17
120	210	395	1/128	9,01	10,45

A l'examen des résultats (tableau XII et fig. 17) on s'aperçoit que, même à l'obscurité, la quantité d'acide chlorogénique est plus élevée

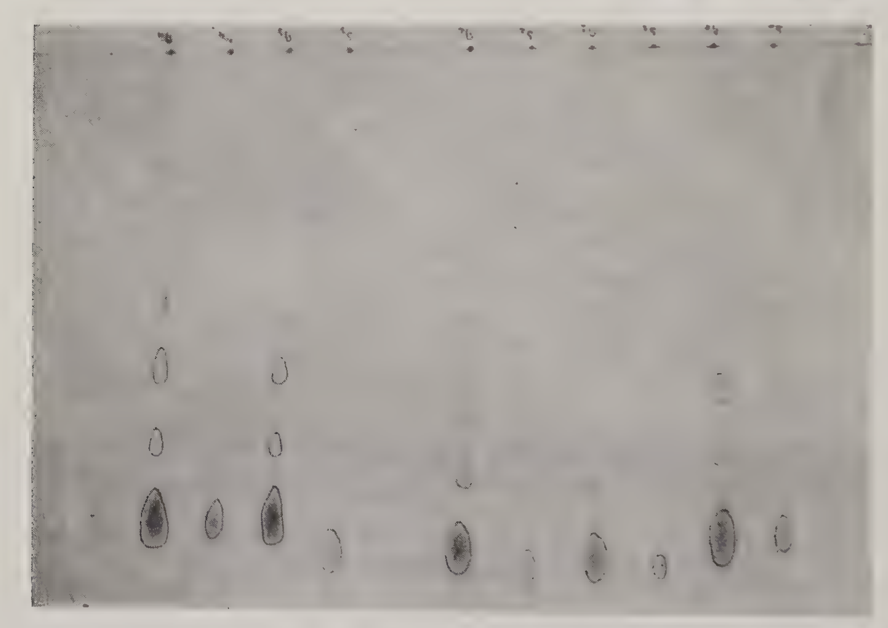


FIG. 18. — Accumulation de phénols dans les germes de Pommes de terre saines et malades (virus Y) en fonction du temps : *De droite à gauche :* S_0M_0 germes à l'obscurité ; S_1 et M_1 après 24 h. d'éclairement ; S_2 et M_2 après 48 h. d'éclairement ; S_3 et M_3 après 72 h. d'éclairement ; S_4 et M_4 après 96 h. d'éclairement ; S = sain ; M = malade.

chez les plantes malades que chez les plantes saines, puisqu'elle est de 290 γ par g de poids frais chez les premières et de 178 γ par g de poids frais chez les secondes. Sous l'influence de la lumière, ces quantités aug-

mentent aussi bien chez les plantes saines que chez les plantes malades, mais cette augmentation est différente dans les deux cas ; en effet, alors que les chiffres passent de 178 à 210 γ par g de poids frais chez les plantes saines, ils varient de 290 à 405 γ par g de poids frais chez les plantes malades. L'évolution de la quantité d'acide chlorogénique est donc beaucoup plus importante chez les plantes malades, ce que l'examen des chromatogrammes révélés au nitrate d'argent permettait déjà de prévoir (fig. 18).

Signalons, avant de passer à un autre chapitre, que l'accumulation de phénols semble apparaître après la synthèse du virus ; il nous est difficile de préciser davantage, car cette étude devrait être réalisée sur Tabac à partir de l'inoculation et en fonction du temps, dans des conditions de température et de lumière bien déterminées et constantes, ce qui n'était pas réalisable dans notre laboratoire.

VII. — MISE EN ÉVIDENCE ET IDENTIFICATION DE CORPS FLUORESCENTS CHEZ LES PLANTES ATTEINTES DE MALADIES A VIRUS

Les phénols qui viennent d'être étudiés apparaissent sur les chromatographies d'extraits de Tabac, lorsqu'on les observe en lumière ultraviolette, sous forme de taches fluorescentes vert pâle. Or, en examinant ces chromatographies, il apparaît deux autres taches, de fluorescence beaucoup plus forte et de couleur bleu violet ; ces taches sont à peine visibles sur les chromatogrammes d'extraits de plantes saines ; elles sont beaucoup plus intenses sur ceux de plantes malades.

Afin d'identifier la plus importante de ces substances fluorescentes, nous avons cherché à en isoler par la technique qui nous a servi à isoler l'acide chlorogénique et ses dérivés. Mais ici une nouvelle difficulté est apparue : la concentration de ces corps dans la feuille est en effet beaucoup plus faible que celle des phénols qui viennent d'être étudiés. Voici la technique d'extraction qui fut utilisée :

5 kg de feuilles de Tabac malade sont broyés dans l'alcool méthylique ; le jus est filtré et concentré sous vide à 40°C. Le résidu sec est repris par de l'alcool éthylique ou méthylique additionné de 2 p. 100 d'ammoniaque, l'addition d'ammoniaque éliminant par oxydation les composés phénoliques ; on concentre à nouveau ce jus et on le dépose en bande continue sur du papier Whatmann n° 3, comme pour les phénols et on le sépare des autres impuretés par chromatographies successives avec comme solvant les mélanges :

Butanol-Acide acétique-Eau 40-10-50.
Butanol-Ethanol-Eau 40-10-20.
Butanol 2 p. 100 d'ammoniaque.

La solution que l'on obtient en concentrant les derniers éluats possède une fluorescence très intense mais malgré cela il a été impossible de la faire cristalliser.

Mais nous avons vu que Best, en 1944 (5), identifie la substance fluorescente qu'il avait mise en évidence chez la Tomate atteinte de Spotted-Wilt et le *Nicotiana glutinosa* inoculé avec la Mosaïque du Tabac, comme étant la scopolétine, c'est-à-dire la 6-méthoxy-7 hydroxy-1-2 benzopyrone :

O

HO C = O

H_3CO CH

CH

Plus tard, en 1953, il affirme avoir retrouvé cette substance chez de nombreuses plantes hébergeant différents virus. D'autre part Andrae (1) retrouve la scopolétine chez les Pommes de terre atteintes du virus de l'Enroulement.

Le travail de ces auteurs laissait à penser que l'on avait affaire, soit à de la scopolétine, soit à une coumarine substituée apparentée à la scopolétine. Les premières chromatographies ont permis d'établir qu'il ne s'agissait pas de scopolétine ; en effet cette dernière à un R_f de 0,85-0,86 dans le mélange Butanol-Acide acétique-Eau 40-10-50, alors que la substance isolée a un R_f de 0,52.

Puis ce corps fut comparé par chromatographie à différentes substances analogues :

— l'aesculetine du commerce,
— l'umbelliferone de synthèse,
— la daphnetine de *Daphne mezereum*,
— la fraxetine de *Fraxinus excelsior*,
— la bergenine de *Bergenia sp.*

Mais toutes ces substances ont des R_f différents.

Dans le but d'étudier sa nature, le corps fluorescent, isolé de Tabac malade, fut alors hydrolysé pendant 5 minutes à l'ébullition par de l'acide sulfurique 3 N ; l'acide fut ensuite précipité par la baryte et le produit d'hydrolyse, concentré sous vide, fut chromatographié sur papier Whatmann n° 1 dans le mélange Butanol-Acide acétique-Eau 40-10-50. Examiné sous lumière ultra-violette, le chromatogramme présente encore une tache fluorescente, mais de R_f beaucoup plus grand que le composé initial, puisqu'il est équivalent à celui de la scopolétine, soit 0,85-0,86. Ce produit d'hydrolyse fut alors chromatographié dans différents solvants avec la scopolétine pour témoin (voir tableau XIII).

Dans tous ces solvants, le corps fluorescent obtenu par hydrolyse avait le même R_f que la scopolétine.

TABLEAU XIII

R_f de la Scopolétine, de la Scopoline du Scopolia, et du corps fluorescent s'accumulant chez les plantes malades, dans différents solvants.

Mélanges de solvants	Scopolétine	Scopoline	Corps fluorescent
Butanol–Acide acétique–Eau 40–10–50	0,85	0,52	0,52
Butanol–Ammoniaque–Eau 150–1–50 .	0,26	0,26	0,26
Isopropanol–Acétone–Eau 10–1–2	0,75	0,35	0,35
Butanol–Éthanol–Eau 40–10–20	0,86	0,59	0,59

Il semble donc bien que le produit d'hydrolyse soit identique à la scopolétine et que le corps fluorescent présent dans les extraits de plantes malades soit un glucoside de cette coumarine substituée. Il restait à identifier le ou les sucres résultant de l'hydrolyse sulfurique. Une chromatographie réalisée dans le mélange Butanol-Acide acétique-Eau a permis de mettre en évidence un seul sucre, de R_f identique à celui du glucose. (Le chromatogramme était révélé grâce au réactif de NOVELLIE (1950) (22), constitué de :

Alcool absolu	50 ml
n. Butanol....................................	50 ml
HCl 3,8 N	0,4 ml
Eau...	0,2 ml
β Naphtylamine	0,100 g.
Sulfate ferrique à 10 %.......................	1 goutte

On chauffe le chromatogramme après l'avoir pulvérisé, à 150°C pendant 10 minutes. Avec ce réactif, les hexoses se révèlent en jaune brun et les pentoses en rose. Afin de vérifier d'une façon absolue l'identité du sucre lié à la scopolétine avec le glucose, nous en avons fait l'osazone, qui s'est révélée absolument identique à celle du glucose pur du commerce.

On connaît actuellement deux glucosides de la scopolétine : la scopoline, corps qui fut isolé pour la première fois par MERZ, en 1932 (20) et la fabiatrine, dans laquelle le sucre est du β primeveroside (CHANDHURY et al. 1948) (9). On rencontre la scopoline dans la racine de diverses espèces du genre Scopolia ; pour s'assurer de l'identité du composé isolé de plantes malades avec la scopoline, nous avons isolé ce corps du *Scopolia carniolica* par chromatographie sur papier Whatmann n° 3, comme cela a été décrit plus haut. Le corps isolé de Tabac se comporte exactement de la même façon que la scopoline du *Scopolia*, par chroma-

tographie dans les différents solvants cités plus haut, et les R_f correspondent à ceux donnés dans le tableau XIII.

Alors que la coumarine est un inhibiteur de croissance et a des effets antagonistes à ceux de l'auxine, on sait que la scopolétine possède, elle, des effets synergiques.

ANDREAE, en 1952 (2) constatant que la scopolétine avait, à certaines concentrations, une action synergique de celle de l'acide indolacétique (I. A. A.) sur l'élongation du coléoptile d'avoine, montre que cette scopolétine est oxydée par les préparations d'oxydase de l'I. A. A. et que sa présence inhibe la destruction de l'I. A. A. par cette oxydase. Il a été montré, d'autre part, que la croissance des racines de pois était

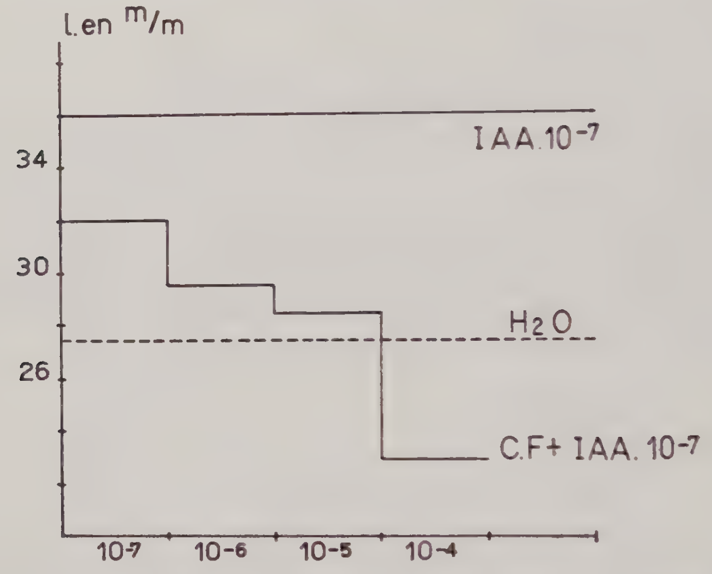


FIG. 19. — Action de la Scopoline sur la croissance du coléoptile d'Avoine. *En abscisses:* la concentration de scopolinel; — *en ordonnées:* l'élongation du coléoptile d'Avoine, en mm.

stimulée par trempage préalable des graines dans une solution à $5,2\text{-}10^{-6}$ M de scopolétine et que cette croissance était inhibée par l'emploi de solutions à $2,6\text{-}10^{-4}$M. Enfin, GOODWIN (1954) (15) montre que la scopolétine augmente l'inhibition de croissance des racines due à l'acide indol-acétique.

Il nous a paru intéressant d'étudier comparativement les effets de la scopolétine et de son glucoside, la scopoline, isolée de plantes malades, sur la croissance des coléoptiles d'avoine.

Nous avons adopté, pour ces essais, la méthode BONNER modifiée par NITSCH (1956) (21). Les concentrations de scopoline essayées variaient entre 10^{-3} et 10^{-9} en poids, soit entre $2,5\text{-}10^{-5}$M et $2,5\text{-}10^{-11}$M. Ces essais nous ont montré (fig. 19) que la scopoline est inhibitrice entre les concen-

trations 10^{-4} et 10^{-7}, soit 2,5-10^{-6}M et 2,5-10^{-9}M, mais elle ne présente d'action synergique de celle de l'I. A. A. à aucune concentration et elle semble beaucoup plus toxique que la scopolétine. On peut expliquer ce fait en admettant la théorie d'ANDREAE (2) ; en effet, la scopolétine ne possédant plus d'hydroxyle libre n'est plus oxydable comme l'est la scopolétine et ne peut plus, de ce fait, protéger l'I. A. A. de l'oxydation ; elle garde par contre toutes ses propriétés inhibitrices. Cette hypothèse est d'ailleurs en partie confirmée par des travaux récents de RABIN et de KLEIN (1957) (24), qui montrent que l'acide chlorogénique protège également l'I. A. A. de l'oxydation ; or, l'acide chlorogénique possède deux hydroxyles à l'état libre sur la fraction acide cafféique et de plus ces auteurs ont également montré que l'inhibition compétitive était due à la partie acide cafféique de la molécule et non à la partie acide quinique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) ANDREAE (S. R.) et ANDREAE (W. A.). — The metabolism of scopoletin by healthy and virus potato tubers. *Can. J. Research*, **27**, 15-22, 1949.
(2) ANDREAE (W. A.). — Effect of scopoletin on indolacetic metabolism. *Nature*, **170**, 58, 1952.
(3) BARNES (H. M.), FELDMAN (J. R.) et WHITE (W. V.). — Isochlorogenic acid. Isolation from Coffee and structure studies. *Contr. from Centr. Labor. Genet. Foods Corpor.* **72**, 4178-4182, 1950.
(4) BATE-SMITH (E. C.) et WESTALL (R. G.). — Chromatographic behaviour and chemical structure. I.Some naturally occurring phenolic substances. *Bioch. Biophys. Acta.*, **4**, 427-440, 1950.
(5) BEST (R. J.). — Studies on a fluorescent substance present in plants. *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.*, **14**, 199-213, 1936.
(6) BLOCK (R. J.), DURRUM (E. L.) et SWEIG (G.). — A Manual of paper chromatography and paper electrophoresis. Academic Press Inc., New-York, 484 p., 1955.
(7) BONNER (J.). — Limiting factors and growth inhibitors in the growth of the Avena Coleoptile. *Amer. J. of Bot.*, **36**, 323-332, 1949.
(8) BRAY (H. C.), THORPE (W. V.) et WHITE (K.). — The application of paper chromatography to metabolic studies of hydroxybenzoic acids and amides. *Biochem. J.*, **46**, 271-275, 1950.
(9) CHANDHURY (D. N.), HOLLAND (R. A.) et ROBERTSON (A.). — The synthesis of glucosides. Part XII : Fabiatrine. *J. Chem. Soc.*, 1671-1672, 1948.
(10) MC FARREN (E.). — Buffered filter paper chromatography of the amino-acids. *Anal. Chem.*, **23**, 168-174, 1951.
(11) FEIGL (F.). — Spot tests. Vol. II, 436 p. Elsevier Publishing Company, 1954.
(12) FISCHER (H. O.) et DANGSHAT (G.). — Konstitution der Chlorogensäure. *Ber.*, **65B**, 1037-1040, 1932.
(13) FOLIN (O.) et MALMROS (H.). — An improved form of Folin's micromethod for blood sugar determinations. *J. Biol. Chem.*, **83**, 115-127, 1929.
(14) FREUDENBERG (K.). — Uber Gerbstoffe. III-Chlorogensäure, der Gerbstoff-artige Bestandteil der Kaffeebohnen. *Ber.*, **53 A.**, 232-234, 1920.
(15) GOODWIN (R. H.) et POLLOCK (B. M.). — Studies on roots I.Properties and distribution of fluorescent constituents in Avena roots. *Amer. J. of Bot.*, **41**, 516-520, 1954.

(16) GORTER (K.). — Uber die Verbreitung des Chlorogensäure in der Natur. *Arch. Pharmaz.*, **247**, 184-188, 1909.
(17) HOEPFNER (W.). — Zwei neue Reaktionen für Kaffeesäure und Chlorogensäure. *Chem. Ztg.*, **56**, 991, 1932.
(18) HOSSFELD (R. L.). — Paper partition chromatography of simple phenols. *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**, 852-854, 1951.
(19) KELEMEN (E.), TANOS (B.), et HALMAGYI (D.). — Separation of p. aminobenzoic acid derivatives by paper chromatography. *Biochem. J.*, **47**, 138-139, 1950.
(20) MERZ (K. W.). — Uber das Cichoriin und die Konstitution des Aesculins und des Scopolins. *Arch. Pharm. u. Ber. Deutsch. Pharm. Ges.*, **270**, 476-495, 1932.
(21) NITSCH (J. P.) et NITSCH (C.). — Studies on the growth of coleoptile and first internode sections. A new, sensitive, straight growth test for auxins. *Plant Physiology*, **31**, 94-111, 1956.
(22) NOVELLIE (L.). — An improved method of detecting sugars on paper chromatograms. *Nature*, **166**, 745, 1950.
(23) PARK (J. T.) et JOHNSON (M. T.). — Sub microdetermination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **181**, 149-151, 1949.
(24) RABIN (R. S.) et KLEIN (R. M.). — Chlorogenic Acid as a competitive inhibitor of indolacetic acid oxidase. *Arch. of Biochem. and Biophys.*, **70**, 11-15, 1957.
(25) ROBERTS (E. A. H.) et WOOD (D. J.). — A study of the polyphenols in Tea leaf by paper chromatography. *Biochem. J.*, **49**, 414-422, 1951.
(26) ROBERTS (E. A. H.) et WOOD (D. J.). — The polyphenols and amino-acids of Tobacco leaf. *Arch. of Biochem.*, **32**, 299-303, 1951.
(27) SHIROYA (M.), SHIROYA (T.) et HATTORI (S.). — Studies on the browning and blackening of plant tissues. IV. Chlorogenic acid in the leaves of Nicotiana Tabacum. *Physiologia Plantarum*, **8**, 594-605, 1955.

MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE DÉTERMINATION DES ACIDES ORGANIQUES CHEZ LES VÉGÉTAUX

PAR

L. ROUX et Mme C. LESAINT

Station centrale de Physiologie végétale, Versailles

PLAN DU MÉMOIRE

I. — INTRODUCTION

A la suite des travaux d'Isherwood (1), Marvel et Rands (2), Bulen, Varner et Burrel (3), et plus récemment de Bove et Raveux (4, 5) la séparation des acides organiques sur gel de silice a accompli de grands progrès et s'est affirmée comme une méthode sûre et efficace. Parallèlement, Busch et coll. (6), Owens et coll. (7), Palmer (8), ont contribué à la mise au point de la séparation sur résine échangeuse d'anions fortement basique : Dowex 1. Nous verrons plus loin l'intérêt respectif de chacune des deux méthodes.

D'autre part, le fractionnement des extraits végétaux fait le plus souvent appel aux résines échangeuses d'ions : fixation des acides aminés sur résine cationique et des acides organiques sur résine anionique.

Par contre, en ce qui concerne le problème de fixation et surtout d'extraction d'échantillons végétaux, la diversité des méthodes existantes est l'indice de leur imperfection. Nous nous sommes attachés plus particulièrement à ce problème et nous proposons ici une méthode d'extraction en deux temps : en milieu alcoolique, puis en milieu acide.

II. — FIXATION DU MATÉRIEL VÉGÉTAL ET EXTRACTION DES ACIDES ORGANIQUES

En ce qui concerne la fixation du matériel végétal, l'emploi classique de l'alcool éthylique à 96° bouillant nous semble le plus sûr lorsqu'on ne s'intéresse pas aux acides labiles (acides cétoniques). La fixation dans l'azote liquide, séduisante dans son principe, rend malaisée la suite des opérations qui doit constamment se dérouler au voisinage de 0°, le réchauffement pouvant provoquer une reprise d'activité enzymatique. La fixation alcoolique permet, d'autre part, de conserver un certain temps à la température ambiante l'échantillon avant son étude.

Quant à l'extraction, notre façon de procéder est guidée par les considérations suivantes :

— l'alcool (ou l'eau neutre) sont de mauvais solvants de certains sels : bitartrate de potassium, oxalate et citrate de calcium... A ce titre, leur emploi est insuffisant.

— une solution d'acide fort dilué (sulfurique, perchlorique) résout convenablement le problème de la libération des acides à partir de leurs sels, mais pose le problème de l'élimination de l'acide ainsi introduit, dont la quantité est prépondérante vis-à-vis de celle des acides extraits. En effet, cet anion extérieur gêne dans la détermination de l'acidité intrinsèque totale de l'extrait et aussi lors de la séparation des acides sur gel de silice : utilisant de l'acide perchlorique, nous avons constaté que celui-ci interfère dans la séparation de l'acide citrique et des acides suivants malgré une précipitation préalable à l'état de perchlorate de potassium (solubilité : 0,75 g par 100 cc à 0°) ; par contre, ce mode d'extraction convient pour une séparation sur résine échangeuse d'anions (9). Une résine échangeuse de cations, fortement acide, sous forme hydrogène, peut jouer le même rôle (10) tout en étant facile à éliminer du jus d'extraction. On peut envisager son emploi exclusif pour l'extraction (10).

Etant donné le mode de fixation choisi (alcool à 96°), nous avons constaté l'utilité d'un épuisement du végétal par l'alcool à 60°, à froid, afin d'éviter le passage de l'amidon à l'état de solution colloïdale lors du traitement par l'eau en présence de résine cationique. Ce procédé s'avère pleinement satisfaisant, même avec des organes riches en amidon (tubercules de pomme de terre, par exemple). D'autre part, les acides aminés se trouvant alors en majeure partie extraits, il est plus facile de définir une quantité de résine assurant un épuisement complet dans tous les cas.

Mode opératoire.

La fixation est réalisée avec une quantité d'alcool à 96° telle que le titre final soit voisin de 80°.

EXTRACTION ALCOOLIQUE :

L'alcool de fixation est séparé par filtration et le matériel végétal broyé dans l'alcool à 60°, à froid, pendant 1 minute, à vitesse maximum (14 000 t/mn), dans un broyeur Servall : les tissus sont finement divisés et offrent à l'alcool une surface de contact maximum, renouvelée très rapidement sous l'effet de l'agitation. Résidu et liquide d'extraction sont séparés par filtration sur Büchner ; le résidu est lavé 2-3 fois sur le filtre à l'alcool à 60° puis desséché en étuve à vide à 30°C.

EXTRACTION ACIDE :

Le résidu d'extraction alcoolique, desséché, est remis en suspension dans de l'eau à 0°C, et l'on ajoute 25 cc de Dowex 50 x 4, 200-400 mesh, forme hydrogène (activée par 3 cycles ClHN-NaOH N) pour 50 g de matière fraîche initiale (2,5 à 12 g de matière sèche). Le tout est maintenu en brassage continu pendant deux heures en chambre froide vers 5°C par agitation électromagnétique ; la finesse des grains de la Dowex 50 assure la réalisation d'une bonne suspension. On sépare l'extrait aqueux par filtration sur Büchner suivie de 2-3 lavages à l'eau du résidu sur le filtre ; ce mode opératoire nous paraît préférable à la centrifugation tant pour sa rapidité que pour son efficacité : pour avoir un culot à surface nette, il faut opérer à des vitesses bien supérieures à 10 000 tours/min et on se trouve alors gêné par le faible volume des tubes de centrifugation. A 10 000 tours/min, il faut faire au moins deux autres centrifugations en diluant chaque fois le culot de chacun des tubes et on se trouve finalement à la tête d'un volume important de liquide.

3 centrifugations de 20 mn à 10.000 t/mn.	% de l'acidité cumulée des 3 surnageants.
—	—
1er surnageant	90,2
2e surnageant	6,7
3e surnageant	3,1

Bilan comparé de l'extraction alcoolique et de l'extraction en milieu acide.

Nous avons, dans le cas de feuilles de *Bryophyllum Daigremontianum*, étudié isolément la composition des extraits alcoolique et acide, obtenus selon la technique ci-dessus ; l'extraction alcoolique comportait de plus ici un second épuisement par remise en suspension du broyat dans l'alcool à 60° et agitation électromagnétique d'une demi-heure suivie de filtration sur Büchner. (Purification des extraits et séparation des acides sur gel de silice relèvent de la suite de l'exposé.)

On voit donc bien que l'extraction à l'alcool, non seulement est incomplète, mais, d'autre part, est plus ou moins poussée selon la nature des acides : assez bonne pour les acides succinique et malique, elle est nettement insuffisante pour les acides citrique et isocitrique.

	Acidité totale en meq/100 gr. de matière fraîche	Acidité alcoolique % de l'acidité totale	Acidité aqueuse % de l'acidité totale	Acide succinique % de l'acide succinique total		Acide malique % de l'acide malique total		Acide citrique % de l'acide citrique total		Acide isocitrique % de l'acide isocitrique total	
				Alcool	Eau	Alcool	Eau	Alcool	Eau	Alcool	Eau
Lot 1.......	14,36	76,4	23,6	94,2	5,8	91,3	8,7	50,6	49,4	67,3	32,7
Lot 2.......	15,03	88,9	11,1	93,8	6,2	96,3	3,7	83,7	16,3	84,5	15,5

Afin de vérifier si notre extraction en présence de résine était suffisante, nous avons réalisé sur quelques échantillons une extraction supplémentaire de même nature : elle a fourni au plus 1,6 p. 100 de la quantité déjà extraite et la chromatographie sur papier n'a permis de déceler aucun acide organique.

III. — PURIFICATION DES JUS D'EXTRACTION

L'utilisation d'échangeurs d'ions exige préalablement l'élimination de l'alcool de l'extrait alcoolique (alcool à 80° + alcool à 60°) : celui-ci est additionné de quelques cc d'ammoniaque 2 N afin de neutraliser les acides libres et éviter des pertes lors de la concentration qui va suivre ; celle-ci est réalisée dans un évaporateur à ballon tournant relié à une trompe à vide (11), à une température de 30-35°. On arrête lorsqu'il ne reste plus que 5 à 10 cc de liquide aqueux. Nous avons vérifié sur mélange synthétique de sels ammoniacaux des acides suivants : glutarique, succinique, malonique, oxalique, malique, citrique et tartrique, que la concentration sous vide d'une telle solution se faisait pratiquement sans pertes :

micro-éq, apportés	713 ± 5
micro-éq. récupérés après concentration et décationisation	709 ± 5

L'extrait alcoolique est parfois riche en pigments qui peuvent même s'insolubiliser au cours de l'évaporation de l'alcool ; cette dernière opération étant réalisée, on peut extraire la majeure partie des pigments par agitation du concentré aqueux avec de l'éther de pétrole en ampoule à décanter. Après repos et séparation de la phase aqueuse, on lave deux fois à l'eau l'éther de pétrole utilisé afin de bien éliminer la phase aqueuse

initiale. Nous avons vérifié sur mélange synthétique analogue à celui indiqué ci-dessus, qu'aucun des acides constituants soit à l'état libre, soit à l'état de sel de soude, ne passait dans l'éther de pétrole au cours de cette opération : l'éther de pétrole a été évaporé et le « résidu » étudié en chromatographie sur papier, en phase acide : on n'observe après révélation aucune tache d'acide.

Elimination des acides aminés. Détermination de l'acidité totale.

Extrait alcoolique épuré et extrait aqueux sont réunis et percolés sur une colonne de permutite 50 sous forme hydrogène (cycles HCl N) : une colonne de diamètre 16 mm et hauteur 180 mm (d'une capacité maximum d'environ 63 milliéq.) convient pour traiter les jus issus de quantités de matière fraîche inférieure à 50 g (ou 2,5 à 12 g de matière sèche). La colonne est lavée à l'eau distillée jusqu'à neutralité et l'effluent titré potentiométriquement, ce qui permet de déterminer exactement le point équivalent quelle que soit la dilution ou la nature des acides.

On peut, à ce stade, prendre une partie aliquote de l'extrait en vue d'une séparation des acides sur gel de silice ou sur résine anionique. Le reste peut être conservé au congélateur à — 20°, — 30°, en flacons de polyéthylène.

Obtention des acides à l'état pur.

La séparation des acides sur gel de silice nécessite une purification supplémentaire : isoler les acides organiques des sucres. Nous utilisons pour cela la résine anionique fortement basique Amberlite IRA 400 sous forme carbonate, préparée d'après BRYANT et OVERELL (12) par deux cycles successifs HCl N-CO_3Na_2 N. Nous régénérons ensuite uniquement avec CO_3Na_2 N. Pour fixer 1 à 1,5 milli-éq. d'acides, nous utilisons une colonne de résine de diamètre 12 mm et hauteur 180 mm. Après lavage de la colonne (environ 100 cc d'eau), les acides sont élués par 200 cc de sesquicarbonate d'ammoniaque 0,2 M. L'éluat est concentré à l'évaporateur à ballon tournant (11) ; au cours de cette opération s'élimine la majorité du carbonate d'ammoniaque en excès. La dessiccation des sels ammoniacaux des acides est amenée à son terme en dessiccateur sous vide en présence de potasse en pastilles et d'acide sulfurique concentré (pour fixer le carbonate d'ammoniaque résiduel), ou en étuve à vide à 30°C.

IV. — SÉPARATION ET DOSAGE DES ACIDES ORGANIQUES

Séparation sur gel de silice.

Nous utilisons la technique proposée par Bove et Raveux (4, 5) qui donne de bons résultats pour les acides classiques. Toutefois :

— l'acide quinique n'est pas séparé ;

— l'acide oxalique chevauche souvent les premières fractions de l'acide malique ;

— dans certains extraits, le dernier mélange éluant fournit des fractions à valeurs de titration élevées se succédant de façon irrégulière et correspondant à des acides, minéraux ou organiques, difficilement identifiables.

Séparation sur résine anionique.

La séparation sur Dowex 1 (8, 9) remédie à certains des inconvénients de la méthode précédente :

— les acides aromatiques (quinique, shikimique) sont élués les premiers, sous forme de pics très aigus ;

— acides citrique et tartrique sont nets de toute interférence avec des acides minéraux ;

— l'acide phosphorique est nettement séparé (bien que non organique, il intervient dans les bilans d'acidité totale).

De plus, elle est rapide : les acides sont fixés directement sur la résine après détermination de l'acidité totale ; l'élution est complète en 120 fractions de 2 cc.

Par contre :

— l'acide oxalique n'est pas élué ;

— les acides pyruvique, malonique, citrique et isocitrique sortent en mélange ;

— l'élimination de l'acide formique des fractions avant titration, sans perte d'acide élué, pose un problème délicat : l'utilisation d'une étuve à vide (9) à 35°C est à ce point de vue satisfaisante.

Identification des acides.

On procède par chromatographie unidimensionnelle en présence d'acides témoins, en solvant butanol — acide formique — eau : 10-2-15 v/v. Après élimination de l'acide formique par ventilation, on révéle au vert de bromocrésol (0,04 p. 100 dans l'alcool à 95°) ajusté à une teinte verte par addition de soude. Les fractions à chromatographier se trouvant sous forme de sel de soude, nous les désalifions directement par

adjonction d'une faible quantité d'une suspension de Dowex 50 sous forme hydrogène ; après agitation et contact un quart d'heure, on peut décanter la fraction désalifiée. Le colorant employé pour la titration des fractions — rouge de phénol — ne gêne pas dans la plupart des cas; lorsque certaines taches se confondent avec lui, on peut l'éliminer préalablement des fractions par adsorption sur une petite colonne de charbon : 1 partie de charbon (Norit, Eastman Kodak, lavé à l'acide chlorhydrique) pour 3 parties de poudre de cellulose (Whatman) — pour diminuer la compacité de la colonne. Une colonne de diamètre 9 mm et hauteur 30 mm suffit pour décolorer une vingtaine de fractions.

Le papier Whatman n° 1 convient pour la chromatographie descendante. En chromatographie ascendante, le Whatman n° 4, plus rapide, permet une migration plus étendue sans altération de la netteté des taches.

V. — BILAN D'UNE DÉTERMINATION

Le critère immédiat d'un bon dosage est le rapport entre l'acidité récupérée à la sortie de la colonne de silice ou de résine et l'acidité globale déterminée après extraction, l'écart acceptable étant inférieur ou au plus égal à 10 p. 100. Or, en ce qui concerne un extrait végétal, il est peu fréquent que la somme des acides séparés dépasse 80 à 90 p. 100 de l'acidité initiale, car :

— des acides cétoniques, ou volatils peuvent se dégrader ou disparaître avant que l'on arrive au terme du dosage ;

— chaque méthode de séparation a un pouvoir de résolution limité, comme on l'a vu plus haut.

Séparation sur gel de silice.

Acide	Micro-éq. initiaux	Micro-éq. récupérés	% de récupération
Pyruvique	59	26	44
Glutamique	55	53	96,5
Succinique	101	98	97
Malonique	94	89	95
Oxalique	67	64	95,5
Malique	195	183	94
Citrique	101	95	94
Tartrique	54	Les deux derniers acides interfèrent avec l'acide tartrique et il n'est pas possible de déterminer la fin de l'élution.	
Quinique	50		
Phosphorique	80		

La meilleure façon de s'assurer de la valeur de l'ensemble des processus de purification et de séparation est de faire passer un mélange synthétique d'acides par la même voie. Voici par exemple deux résultats

se rapportant à des mélanges synthétiques séparés, l'un sur gel de silice, l'autre sur Dowex 1 x 10, la séparation sur silice étant effectuée après passage sur permutite 50, fixation sur amberlite IRA 400, élution au sesquicarbonate d'ammoniaque et concentration de l'éluat jusqu'à siccité, et celle sur Dowex 1 après passage sur Permutite 50 et fixation directe sur Dowex.

Séparation sur Dowex 1 × 10.

Acide	Micro-éq. initiaux	Micro-éq. récupérés	% de récupération
Quinique (1)	52	36	69 %
Malique	210	209	100 %
Tartrique	66	59	89,5 %
Citrique	100	177	90,5 %
Malonique	96		
Phosphorique	102	97	96 %
Oxalique	65	0	0

(1) L'échantillon d'acide quinique utilisé était très impur, ce qui explique le faible pourcentage de récupération.

Nous avons effectué de nombreux dosages en utilisant principalement jusqu'ici la séparation sur gel de silice, et les résultats obtenus ont été très reproductibles. En ce qui concerne les séparations sur Dowex 1, il convient de préparer à l'état formiate un grand volume de résine et d'en tester préalablement une partie aliquote avec des acides connus ; il faut d'autre part apporter beaucoup de soin à la dessiccation des fractions : ne pas les chauffer au-delà de 35° et les retirer de l'étuve à vide dès siccité. A ces conditions, la reproductibilité est également convenable.

RÉSUMÉ

On a décrit une technique d'extraction quantitative des acides organiques des tissus végétaux par emploi successif d'éthanol et de résine échangeuse de cations : une extraction à froid par l'alcool à 60° évite le passage de l'amidon en pseudosolution ; l'extraction du résidu séché par l'eau en présence d'une résine cationique, libère les acides de leurs combinaisons insolubles dans l'eau seule. En ce qui concerne la séparation des acides, le choix, soit du gel de silice, soit d'une résine anionique (Dowex 1), soit des deux techniques conjointement, se justifie par la nature des acides à séparer.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Isherwood (F. A.). — *Biochim. J.*, **40**, 688-695, 1946.
(2) Marvel (S.) et Rands (R. D.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **72**, 2642-2646, 1950.
(3) Bulen (W. A.), Varner (J. E.) et Burrell (R. G.). — *Anal. Chem.*, **24**, 187-190, 1952.
(4) Raveux (R.) et Bove (J.). — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 369-376, 1957.

(5) BOVE (J.) et RAVEUX (R.). — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 376-381, 1957.
(6) BUSCH (H.), HURLBERT (R. B.) et POTTER (W. R.). — *J. Biol. Chem.*, **196**, 717-727, 1952.
(7) OWENS (H. S.), GOODBAN (A.) et STARK (J. B.). — *Anal. Chem.*, **25**, 1507-1511, 1953.
(8) PALMER (J. K.). — *Bull. Connect. Agric. Exp. Station*, **589**, 1-31, 1955.
(9) FAUCONNEAU. — *Annales Physiologie Végétale*, **1**, 1-14, 1958.
(10) BOVE (J.), BOVE (C.) et RAVEUX (R.). — *Rev. Gén. Bot.*, **64**, 572-592, 1957.
(11) CRAIG (L. C.), GREGORY (J. D.), HAUSSMANN (W.). — *Anal. Chem.*, **22**, 1462, 1950.
(12) BRYANT (F.) et OVERELL (B. T.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 471-76, 1953.

ÉTUDE DES VARIATIONS DES SUBSTANCES AZOTÉES AU COURS DE LA VÉGÉTATION DE L'ORGE

(1er MÉMOIRE) (1)

ÉTUDE DE LA GERMINATION

PAR

J. M. LEFEBVRE
Station centrale de Physiologie végétale, Versailles.

PLAN DU MÉMOIRE

HISTORIQUE

Les travaux de E. SCHULZE (2) accomplis entre 1877 et 1900 et, plus tard, de PRIANISCHNIKOV, sont à la base de nos connaissances du métabolisme azoté des germinations et des plantules. Les résultats qu'ils ont obtenus ont été maintes fois confirmés et leurs hypothèses n'ont subi généralement que quelques retouches qui les ont précisées.

PRIANISCHNIKOV (1900) montra que la genèse des amides est liée à la respiration. PALLADINE (1893), puis PAECH (1935) ont précisé les relations existant entre les protides et les glucides dans les diverses germinations (*Triticum sativum, Lupinus albus*), et montré qu'une protéogenèse active demande un équilibre entre les quantités de substances azotées et celles de glucides.

CHIBNALL (1939) et MOYSE (1951) ont résumé les grands traits du métabolisme azoté d'après les auteurs précédents, et analysé les liens

(1) Extraits d'une thèse de Doctorat de l'Université de Paris.
(2) Voir CHIBNALL A. C. (1939).

existant entre la stabilité des protéines et les teneurs en glucides des tissus d'une part, les dégradations, les synthèses, la vitesse des migrations des oses et des amino-acides entre les organes de réserve et les tissus embryonnaires d'autre part.

VIRTANEN et coll. (1938, 1943) ont montré que les plantules écrasées de Pois contenaient des diastases permettant la transamination entre l'acide aspartique et l'acide pyruvique avec formation d'alanine.

RAUTANEN (1948) a montré également que l'alanine était le principal amino-acide formé par transamination qui peut se faire aussi bien aux dépens de l'acide glutamique que de l'acide aspartique.

YEMM (1954) a séparé par chromatographie sur papier les différents acides aminés résultant de l'hydrolyse des protéines au cours de la germination de l'Orge, et insisté sur l'importance des transaminations et des transamidations qui ont lieu avant la condensation des amino-acides et des amides dans les protéines néoformées de l'embryon.

MEISS (1952) constate que, chez *Lupinus albus*, l'asparagine n'est toujours présente qu'en très faible quantité dans les cotylédons, alors qu'elle se forme très abondamment dans les organes axiaux des germinations. Les variations des quantités de glutamine sont beaucoup plus faibles.

Dans les germinations de Blé, la respiration est trois à six fois plus intense dans les organes axiaux que dans l'albumen (MET, 1950). Cette observation s'accorde bien avec celle de MEISS, puisque la formation d'amides est liée aux oxydations respiratoires.

Les uréides glyoxyliques prennent place à côté des amides dans les mécanismes de dégradation qui se produisent au cours des germinations, et on peut les considérer comme les produits secondaires d'hydrolyse et d'oxydation des nucléoprotéines.

Les expériences exposées ci-dessous ont pour but d'étudier le métabolisme azoté des germinations d'Orge, effectuées à l'abri de la lumière, à différentes températures, et d'établir la part revenant aux hydrolyses, aux oxydations respiratoires génératrices d'amides, et à la condensation des substances azotées solubles, dans les remaniements des protéines de réserves, qui aboutissent à l'élaboration des protéines des organes en croissance.

MÉTHODES ET TECHNIQUES

Les germinations ont été effectuées à trois températures :

6°C-12°C-25°C.

L'aseptie des graines est obtenue par immersion des grains dans une solution de bichlorure de mercure à 0,2 p. 100 dans l'alcool éthylique à 70° G. L. Après cinq minutes de contact, la solution est éliminée

et cinq rinçages à l'eau bidistillée stérile débarrassent les grains des traces du sublimé.

Cent grains aseptisés sont déposés dans une boîte de Pétri de 120 mm, sur une rondelle de papier filtre stérile. Dix cm³ d'eau stérile sont ajoutés.

Chaque série de germination comprend au minimum 50 boîtes, ce qui permet un échantillonnage correct de 200 grains prélevés au hasard lors de chaque prélèvement.

Lorsque la germination est assez avancée, les plantules sont séparées de l'albumen à l'aide d'un scalpel.

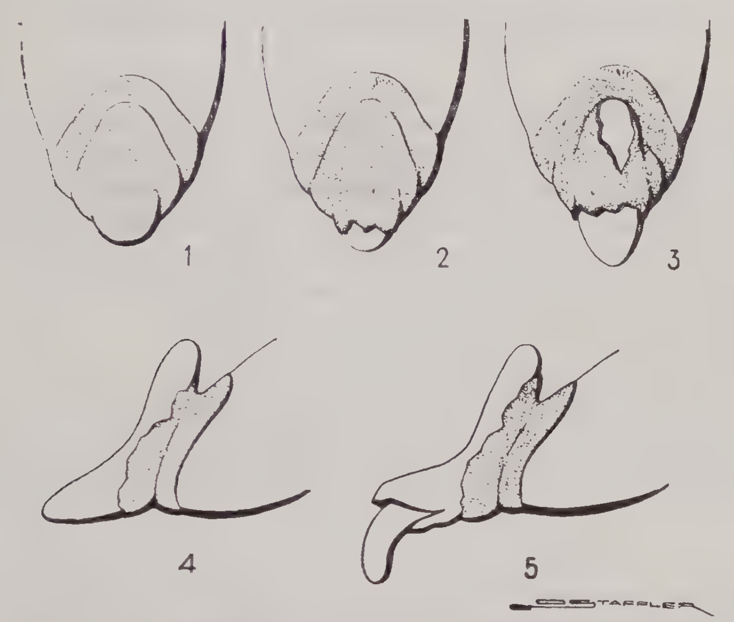


FIG. 1. — Etapes de la germination chez l'Orge d'après DOMMERGUES. 1 : gonflement du grain ; 2, 3, 4, : croissance de la coléorhize; 5 : présence de la radicule.

Pour suivre l'évolution des germinations, il est intéressant de préciser leur état lors des prélèvements. DOMMERGUES (1951) a défini différents stades de façon précise sur l'Orge Aurore. Il distingue : le gonflement de l'embryon (fig. 1), l'apparition de la coléorhize (fig. 2, 3, 4), l'apparition de la radicule (fig. 5). A partir de ce dernier état, il est possible d'apprécier la croissance en mesurant la longueur de la radicule ou du coleoptile.

Ces différents stades ont été utilisés comme repères au cours de la germination.

Préparation des échantillons végétaux.

La fixation du matériel vert est faite par séjour de deux heures dans une étuve ventilée à 68°C, la dessiccation est terminée dans un dessicca-

teur, sous vide, en présence de P_2O_5 à la température du laboratoire et à l'abri de la lumière, pendant 1 ou 2 mois jusqu'à poids constant. La pesée permet alors d'obtenir le poids de substance sèche.

On sait que dans ces conditions la glutamine est peu altérée. VICKERY et coll. (1935), PUCHER et coll. (1935). A 68°C, et en 90 mn, les pertes d'azote amidé provenant de la dégradation de la glutamine sont de l'ordre de 5 p. 100. A 85°C, elles sont beaucoup plus importantes, et atteignent facilement 20 p. 100.

Extraction et dosages des composés azotés solubles.

Les prises d'essai de 0,5 à 5 g sont broyées dans un mortier, réduites en poudre fine et extraites à chaud dans un bécher par l'alcool à 50° G. L. à 80°C au bain-marie (MOYSE, 1950), pendant 10 mn. Le liquide surnageant est filtré sur Buchner avec légère aspiration. Le résidu est repris 4 fois par l'alcool à 50° G. L. dans les mêmes conditions. La fraction insoluble est jetée quantitativement sur le filtre et lavée.

L'extrait est amené à 150 cc et conservé au frigidaire.

Sur cet extrait, les dosages suivants sont faits :

N soluble total	N amidé total.
N du précipité trichloracétique	N amidé instable.
N ammoniacal	N aminé libre.
N nitrique	N du précipité phospho-tungstique.

a) DOSAGE DE L'AZOTE PROTÉIQUE

Le filtre et le résidu insoluble sont traités selon Kjeldahl et l'ammoniaque distillée recueillie dans l'acide borique et titrée par HCl N/70.

Une partie aliquote de l'extrait est traitée par l'acide trichloracétique amené à une concentration de 10 p. 100 dans un tube de centrifugeuse. Après un séjour de 24 heures à 0°C, la concentration permet de recueillir le précipité trichloracétique. L'N de celui-ci est dosé dans les mêmes conditions et ajouté à l'N du résidu insoluble. La somme correspond à l'N protéique.

b) DOSAGE DE L'AZOTE SOLUBLE TOTAL

Après réduction des nitrates par l'acide phénylsulfurique, la prise d'essai de l'extrait soluble est minéralisée selon Kjeldahl.

La quantité d'N du précipité trichloracétique est retranchée de la quantité d'azote obtenue. La différence correspond à l'N soluble total réel.

c) Dosage de l'azote ammoniacal

L'N ammoniacal est distillé selon Bach (1932), sous pression réduite dans l'appareil d'Yovanovitch (1925) par entraînement par un courant de vapeur d'eau et recueilli dans l'acide borique à 1 p. 100.

d) Dosage de l'azote nitrique

Après réduction des nitrates par l'alliage Dewarda, l'ammoniaque obtenue est distillée dans l'appareil d'Yovanovitch (voir-ci-dessus).

e) Dosage de l'azote amidé total

La méthode utilisée est celle de Vickery et coll. (1935). Les amides contenues dans une partie aliquote de l'extrait soluble sont hydrolysées par SO_4H_2 N et l'ammoniaque distillée dans l'appareil d'Yovanovitch.

La quantité d'N amidé est obtenue après soustraction de la quantité d'ammoniaque préexistante.

f) Dosage de l'azote amidé instable

La méthode suivie est celle de Vickery et coll. (1935), basée sur l'hydrolyse de la fonction amide de la glutamine à pH 6,5, et le dosage de l'ammoniaque libérée ; l'asparagine n'est pas hydrolysée dans ces conditions.

L'N amidé de l'asparagine est obtenu par différence entre l'N amidé total et l'N amidé instable.

Dans les tableaux numériques figurent l'N total de l'asparagine et l'N total de la glutamine. Ils sont égaux au double des quantités d'azote amidé correspondantes.

g) Dosage de l'azote aminé

On utilise la méthode eudiométrique de Van Slyke (1911, 1912) basée sur la réaction de NO_2H sur le groupement NH_2 des acides aminés avec libération d'azote gazeux dont le volume est directement mesuré.

Dans les tableaux numériques qui suivent, l'N des amino-acides correspond à N aminé dosé diminué d'une quantité égale à N amidé total, afin de ne tenir compte que de l'N appartenant à des amino-acides à l'exception des amides, et d'une quantité égale à celle de l'N amidé instable, la fonction amide de la glutamine réagissant également avec No_2H.

h) DOSAGE DE L'AZOTE DU PRÉCIPITÉ PHOSPHOTUNGSTIQUE

En première approximation, l'N du précipité phosphotungstique appartient aux polypeptides (DELAUNAY, 1927).

La valeur obtenue est diminuée de la quantité d'N du précipité trichloracétique et de la quantité d'N ammoniacal.

EXPÉRIENCES ET RÉSULTATS

1° Germination à 6°C.

A cette température, la germination est extrêmement lente. Il faut trois jours pour que la pointe du coleoptile apparaisse sur le germe alors que quelques heures suffisent à 25°C. Au bout de 15 jours, les coleoptiles ont 1,5 cm de longueur et ne sont pas encore percés par la première feuille.

Le tableau I et la figure 2 indiquent les résultats des analyses.

TABLEAU I

Variations du poids de substance fraîche, du poids de substance sèche (en g) et des formes azotées (en mg) pour 100 individus. Température 6° C.

St = stade C = coléoptile, longueur en mm

	0 h.	64 h. St : 3	136 h. St : 5	184 h. C = 2	232 h. C = 8	280 h. C = 10	328 h. C = 15
Poids de substance fraîche	4,41	6,37	7,50	8,57	9,41	9,53	9,61
Poids de substance sèche	4,08	4,07	4,08	4,07	4,01	3,78	3,73
Teneur en eau p[r] 100 parties substance sèche	8,2	56	84	110	134	152	158
N protéique	58,7	57,1	52,7	48,6	45,4	42,4	42,0
N total des amides	1,5	2,0	3,1	5,0	5,7	4,9	6,1
N de l'asparagine (1)	1,5	2,0	3,1	5,0	5,7	4,9	6,1
N des amino-acides	1,7	2,0	2,8	1,6	3,7	1,9	1,2
N du p[te] phospho-tungst.	1,5	5,3	4,1	6,3	5,8	7,9	9,7
N org. soluble	10,8	10,7	12,7	16,0	18,9	20,3	20,2
N org. total	69,5	67,8	65,4	64,6	64,3	62,7	62,2
N ammoniacal	1,0	1,2	1,3	1,0	0,8	0,8	1,0
N nitrique	1,4	1,3	1,9	2,3	2,6	3,1	2,5
N soluble total	13,2	13,2	16,0	19,3	22,3	24,2	23,7
N total	71,9	70,3	68,6	67,9	67,7	66,6	65,7
R. : N protéique / N org. soluble	5,4	5,3	4,1	3,0	2,4	2,0	2,0
R. : N protéique / N des amino-acides	33,6	28,6	19,1	30,6	12,3	23,0	35,9
R. : N des amino-acides / N des amides	1,2	1,0	0,9	0,3	0,6	0,4	0,2

(1) La glutamine n'existant qu'à l'état de traces, la totalité de l'N amidé peut être attribuée à l'asparagine.

Variations des formes azotées

L'N protéique (1,44 p. 100 du poids de substance sèche du grain) diminue lentement et régulièrement pendant les 280 premières heures de l'expérience. Il ne représente que 1,12 p. 100 du poids de substance sèche après 328 heures.

La vitesse de la protéolyse, lente pendant les premières heures au cours du gonflement du grain, augmente ensuite rapidement jusqu'à ce que le coleoptile ait 10 mm de longueur, puis se ralentit.

Si le bilan protéique reste à peu près constant en fin d'expérience, lors de l'élongation du coleoptile et de la sortie des premières radicelles,

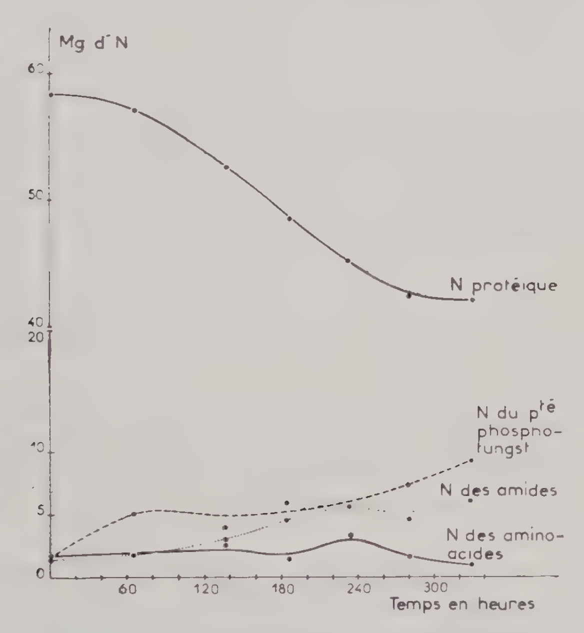


FIG. 2. — Germination du grain d'Orge à 6° C.
Variations des formes azotées exprimées en milligrammes d'N pour 100 grains.

il semble bien qu'il résulte alors de la compensation entre la protéolyse dans l'albumen et la protéogenèse dans les organes axiaux, ainsi que le montrent les expériences effectuées à des températures plus élevées.

Le taux de l'Azote organique soluble augmente régulièrement et double pendant la durée de l'expérience (0,26 p. 100 du poids de substance sèche au début et 0,54 p. 100 à la fin).

L'examen du rapport $\frac{\text{N protéique}}{\text{N org. soluble}}$ nous renseigne, au moins au début de l'expérience, sur la vitesse de proteolyse. Il passe de 5,4 à 2,0 pendant les 280 premières heures. Ensuite, il traduit par sa constance

l'équilibre entre la proteolyse et la protéogenèse dès que le coleoptile dépasse 10 mm.

L'augmentation de l'azote du précipité phosphotungstique est régulière. Il semble que les polypeptides soient libérés plus rapidement qu'ils ne sont fragmentés en peptides plus simples et en acides aminés.

L'azote des amino-acides libres est peu variable, la proteolyse étant lente. Au moment de l'élongation du coleoptile, la protéogenèse dans les organes axiaux est suffisamment active pour équilibrer la proteolyse et, de ce fait, les amino-acides se recondensent rapidement dans des combinaisons protidiques.

La glutamine n'a pu être mise en évidence. L'N des amides correspond essentiellement à celui de l'asparagine dont une partie provient directement de l'hydrolyse des protéines. LUGG (1939) a montré qu'il existe 5 p. 100 d'N amidé dans les protéines de *Dactylis glomerata* et de *Lolium perenne*. Cependant, l'accroissement plus élevé de l'N des amides que de l'N des amino-acides indique que les oxydations interviennent d'une façon non négligeable. Ces oxydations sont sensibles dès que le coleoptile a 2 mm de longueur et que la croissance de la plantule devient importante, celle-ci étant, comparée à l'albumen, un milieu de forte respiration.

L'N ammoniacal, toujours en quantité faible, peut provenir pour une grosse partie, de l'hydrolyse de composés instables, tels que la glutamine, au cours des manipulations.

L'N réduit en présence d'alliage Dewarda, considéré habituellement comme N nitrique, peut également provenir des ureides et des purines abondantes dans les graines en germination et décomposées en partie lors des analyses. Aussi n'est-il pas possible d'interpréter les faibles variations observées.

En résumé, à cette température l'imbibition des tissus est lente, l'hydrolyse des protéines est peu élevée et la vitesse d'oxydation des amino-acides permettant la formation d'amides est faible.

Quand le coleoptile atteint 2 mm de longueur, la protéogenèse commence à se manifester de façon sensible dans la jeune plantule, le maximum de la protéolyse ayant lieu entre l'apparition de la coleorhize et celle du coleoptile.

2° Germination à 12°C.

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau II. La figure 3 représente également les variations observées.

La protéolyse est plus active qu'à 6°C. Il en résulte une diminution sensible du taux d'N protéique. De 1,25 p. 100 du poids de substance sèche au début de l'expérience, le taux d'N protéique n'est plus que de 0,85 p. 100 après 192 heures de germination.

TABLEAU II

Variations du poids de substance fraîche, du poids de substance sèche (en g) et des formes azotées (en mg).

Température 12° C. *Résultats établis pour 100 graines ou plantules.*

St = stade C = coléoptile, longueur en mm A = albumens + enveloppes P = plantules.

Temps en heures	0 h.	24 h. St : 3	48 h. St : 5 +	72 h. C = 5	96 h. C = 8	120 h. C = 10	144 h. C = 15	168 h. C = 20	192 h. A	192 h. C = 25P	192 h. A + P
Poids de substance fraîche	4,45	6,09	6,87	7,63	8,45	9,16	10,39	11,82	6,13	5,73	111,86
Poids de substance sèche	4,07	4,05	4,04	4,03	4,03	3,92	3,92	3,87	3,16	0,68	3,84
Teneur en eau p^r 100 parties substance sèche	9,1	50	70	90	110	134	165	205	94	740	210
N protéique	58,6	55,5	51,9	46,7	43,0	40,3	37,4	34,8	27,1	5,6	32,6
N des amides instables	1,3	0,3	1,6	0,3	1,3	1,3	0,6	—	0,9	1,3	2,2
N total des amides	2,3	2,0	6,4	4,3	6,3	5,6	7,3	7,9	4,6	2,9	7,5
N de l'asparagine	1,0	1,7	4,8	4,0	5,0	4,3	6,7	—	3,7	1,5	5,3
N des amino-acides	3,8	5,2	2,8	10,1	8,0	6,0	10,3	13,7	6,2	10,8	17,1
N du p^te phospho-tungst.	4,9	0,8	3,3	7,6	7,2	6,6	5,4	4,9	3,3	3,3	6,6
N org. soluble	8,4	10,6	13,0	15,6	17,5	19,7	22,7	26,4	12,9	13,7	26,6
N org. total	67,0	66,1	64,9	62,3	60,5	60,0	60,1	61,2	40,0	19,3	59,3
N ammoniacal	1,6	2,1	2,0	2,3	1,8	2,0	2,0	2,3	1,4	1,4	2,8
N nitrique	1,9	2,5	3,2	3,3	3,1	3,0	2,3	2,3	1,8	0,8	2,6
N soluble total	11,9	15,2	18,1	21,2	22,4	24,7	27,0	31,0	16,1	15,9	32,0
N total	70,5	70,7	70,0	67,9	65,4	65,0	64,4	64,8	43,2	21,5	64,6
R. : $\frac{\text{N org. soluble}}{\text{N protéique}}$	7,0	5,3	4,0	2,8	2,4	2,0	1,6	1,3	2,1	0,4	1,2
R. : $\frac{\text{N des amino-acides}}{\text{N protéique}}$	15,4	10,6	18,5	4,6	5,4	6,0	2,8	2,5	4,3	0,5	1,9
R. : $\frac{\text{N des amino-acides}}{\text{N des amides}}$	1,7	2,6	0,4	2,3	1,3	1,1	1,7	1,7	1,3	3,8	2,3

L'examen de la figure 3 montre la décroissance régulière de l'N protéique. La pente de la courbe diminue légèrement à partir de l'apparition du coleoptile (72 heures de germination) marquant une accélération de la proteogenèse par rapport à la proteolyse.

A partir de 144 heures de germination, où le coleoptile atteint 15 mm, on observe des hydrolyses d'étiolement, les expériences étant pratiquées

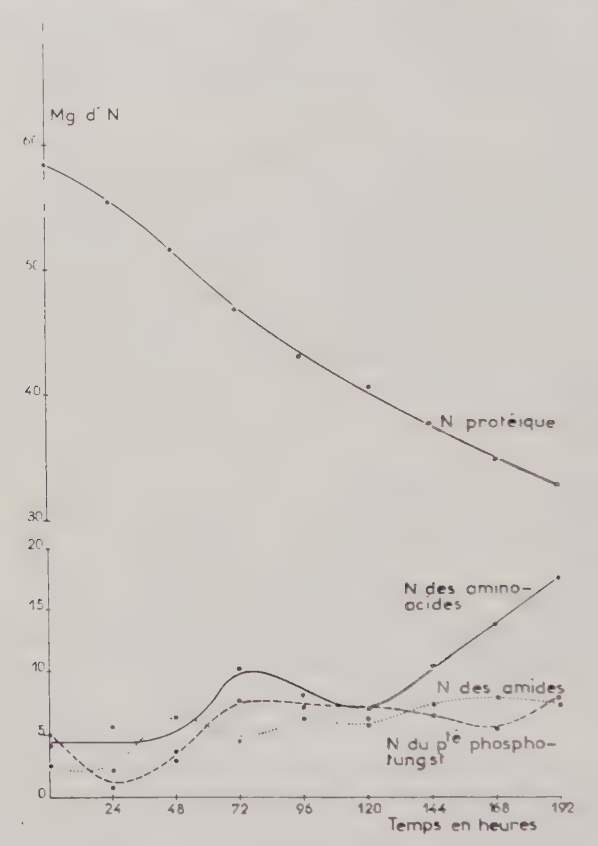


FIG. 3 — Germination du grain d'Orge à 12°C.
Variations des formes azotées exprimées en milligrammes d'N pour 100 grains.

à l'obscurité pendant un temps très long. Ces hydrolyses que l'on observe particulièrement d'après les variations des amino-acides, masquent en partie la protéogenèse dominante aux derniers stades.

Les variations de l'N du précipité phosphotungstique sont importantes et irrégulières. Il semble qu'il y ait dès le début de la germination, aux premiers stades de l'imbibition du grain, une hydrolyse importante des polypeptides présents dans la graine. Ensuite, la proteolyse en libère et leur quantité augmente rapidement, puis, dès que le coleoptile atteint 5 mm, ils disparaissent à peu près aussi rapidement qu'ils sont engendrés. Il est possible que des bases puriques et de la choline soient présentes

en quantité importante comme c'est le cas lors de la germination du Soja (ECHEVIN et coll., 1937, DUCET, 1949).

La protéolyse est très active dès le début, et une fraction des acides aminés disparaît au moment de la proteogenèse dans les organes axiaux (120 heures). De plus, à ce moment intervient un autre phénomène dû aux hydrolyses d'étiolement. L'hydrolyse des réserves protéiques de l'albumen se poursuit régulièrement alors que la quantité d'amino-acides libres croît très rapidement.

La présence de glutamine est décelable à cette température, particulièrement dans la jeune plantule.

Au début de la germination, pendant la période d'imbibition rapide, la quantité d'amide semble diminuer légèrement, puis elle augmente rapidement pendant les 24 heures qui suivent. L'augmentation est due à l'hydrolyse des protéines et peut-être à une oxydation préalable des amino-acides alors que la respiration est très intense.

A la sortie de la plantule, on constate une diminution de la quantité des amides, aussi peut-on supposer un retour à la synthèse des amino-acides à ce stade.

En résumé, à 12°C, la lenteur relative des phénomènes permet bien de saisir les différentes phases de la germination :

a) Hydrolyse des protéines augmentant avec la teneur en eau jusqu'au dégagement net du coleoptile, avec oxydation négligeable des amino-acides, l'augmentation des amides étant due essentiellement à leur libération des protéines.

b) Protéogenèse dominante dans les organes axiaux.

c) Proteolyses d'étiolement dans les jeunes plantules maintenues à l'obscurité, en fin d'expérience.

3° **Germination à 25°C.**

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau III et la figure 4.

La graine s'imbibe très rapidement. L'hydrolyse des protéines est très rapide. Pendant les 18 premières heures, jusqu'à l'apparition du coleoptile, la valeur moyenne de la proteolyse est constante.

Après 24 heures, le coleoptile dépassant 5 mm, on observe un ralentissement de la perte d'N protéique, la protéogenèse devenant très active dans les jeunes tissus en formation alors que la proteolyse dans l'albumen suit son cours à la même vitesse.

Les plantules sont capables, dès l'apparition du coleoptile, d'utiliser de façon très rapide l'N soluble pour recréer de nouvelles protéines.

L'N organique soluble augmente rapidement jusqu'à la sortie du coleoptile (24 heures) puis sa quantité diminue à la suite de la protéogenèse dans les organes axiaux.

Tableau III

Variations du poids de substance fraîche, du poids de substance sèche (en g) et des formes azotées (en mg).

Température 25° C. *Résultats établis pour 100 graines ou plantules.*

Température 25° C. St = stade C = coléoptile, longueur en mm A = albumens + enveloppes P = plantules.

Temps en heures	0 h.	6 h. St : 2	12 h. St : 4	18 h. St : 5 +	24 h. C = 5	48 h. C = 12	72 h. A	72 h. C = 25P	72 h. A + P	96 h. A	96 h. 1er f. F	96 h. A + P
Pds subst. fraîche	4,37	5,64	6,11	6,66	6,83	8,84	5,58	3,51	9,10	4,77	5,18	9,95
Pds subst. sèche	4,02	4,02	4,01	4,0	3,94	3,81	2,84	0,90	3,75	2,50	1,02	3,53
Teneur en eau p. 100 part. subst. sèche	8,8	40	52,5	66	73	132	96	288	142	90	410	184
N protéique	58,5	53,6	49,7	43,1	41,6	37,7	20,2	13,0	33,2	12,4	19,3	31,7
N des amides inst.	1,6	1,8	1,6	2,7	1,1	2,4	2,2	0	2,2	1,2	0	1,2
N total des amides	2,5	6,0	4,4	4,1	3,5	4,5	2,8	1,9	4,8	1,7	3,4	5,2
N de l'asparagine	0,9	4,2	2,8	1,4	2,4	2,1	0,6	1,9	2,6	0,5	3,4	4,0
N des amino-acides	2,9	2,1	5,4	12,4	16,3	19,2	7,4	3,0	10,4	5,3	2,8	8,1
N pte phospho. tungt	4,2	4,3	5,3	3,3	1,8	3,2	3,4	1,2	4,6	3,2	3,6	6,8
N org. soluble	8,7	11,8	16,1	22,5	23,0	26,5	17,3	6,4	23,7	11,0	9,2	20,1
N org. total	67,2	65,4	65,8	65,6	64,6	64,2	37,5	19,4	56,9	23,4	28,5	51,9
N ammoniacal	1,6	1,1	1,3	1,4	2,1	2,4	2,1	1,7	3,8	2,0	2,0	4,0
N soluble total	11,3	16,4	20,6	26,6	28,1	32,1	22,6	12,6	35,2	15,8	18,5	34,3
N total	70,3	70,3	70,3	69,8	69,8	69,8	42,8	25,6	68,4	28,2	37,8	66,0
R. : N org. soluble / N protéique	6,7	4,5	3,1	1,9	1,8	1,4	1,1	2,0	1,1	1,1	2,1	1,5
R. : N des amino. ac. / N protéique	20	25,5	9,2	3,4	2,5	2,0	2,7	4,3	3,2	2,3	6,8	3,9
R. : N des amino ac. / N des amides	1,1	0,3	1,2	3,0	4,6	4,2	2,6	1,5	2,1	3,0	0,8	1,6

Les quantités de polypeptides augmentent légèrement au début de la germination, puis leur hydrolyse est active jusqu'à l'allongement du coléoptile.

Dans la plantule, les substances précipitables par l'acide phosphotungstique représentent le quart de l'N soluble total.

Au cours de l'imbibition du grain, pendant les six premières heures, on observe une diminution des amino-acides libres qui se retrouvent oxy-

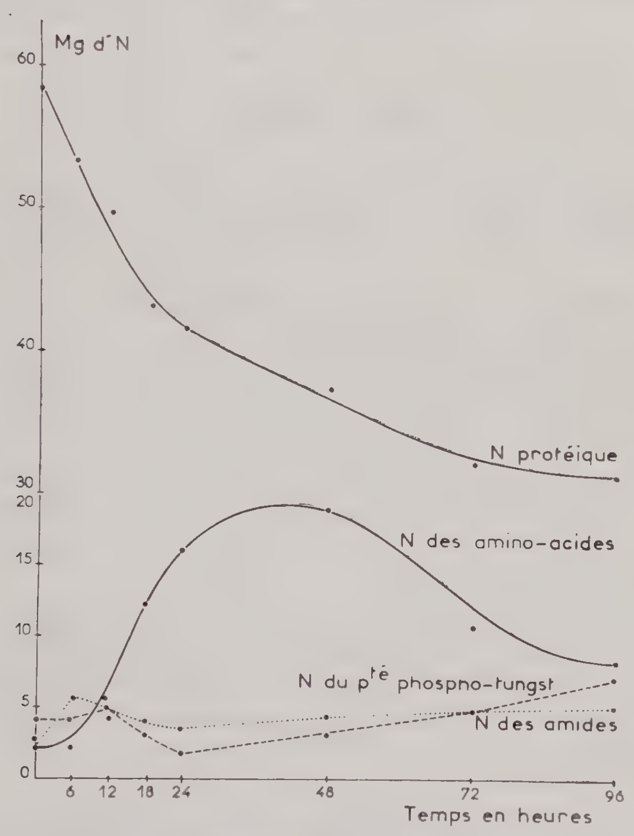


FIG. 4. — Germination du grain d'Orge à 25°C.
Variations des formes azotées exprimées en milligrammes d'N pour 100 grains.

dés en amides. Puis la libération des acides aminés est régulière et très rapide (800 p. 100 du taux primitif en 18 heures).

Après 48 heures, la recombinaison des amino-acides est plus élevée que leur libération, leur teneur diminue rapidement surtout dans la plantule.

Au début de l'expérience, l'augmentation de la teneur en amides est à rapporter essentiellement à l'asparagine. Cette augmentation suit la proteolyse et l'oxydation d'une fraction des amino-acides pendant

l'imbibition. Ensuite, dans l'ensemble, les quantités d'amides restent constantes.

En résumé, à 25°C, la proteolyse atteint très rapidement sa vitesse maximum dès que la graine a absorbé une quantité d'eau sensiblement égale à la moitié de son propre poids.

L'oxydation des amino-acides est très fugace et peu intense. Elle se manifeste seulement de façon appréciable dans la jeune plantule où les oxydations sont importantes. Ce résultat confirme les observations de MEISS (1952) faites sur des germinations de *Lupinus albus*.

CONCLUSIONS

Au cours de la germination effectuée à l'obscurité et à des températures comprises entre 0°C et 25°C, la vitesse de croissance de la plantule est fonction de deux facteurs essentiels : la température et l'humidité.

Au tout début de la germination, les mêmes stades morphologiques se retrouvent pour une teneur en eau égale de la graine, aux diverses températures. Par exemple, les graines atteignent au cours de la germination le stade 3, où la coléorhize et le coléoptile pointent, pour une teneur en eau de 50 p. 100 parties de substance sèche.

L'augmentation de la température accélère la vitesse de l'imbibition. Il en résulte que tous les processus chimiques débutent plus tôt lorsque la température s'élève ; de plus, leur vitesse s'accroit avec l'élévation du facteur thermique.

La comparaison des résultats obtenus dans le même temps aux trois températures expérimentées (tableau IV) permet d'observer qu'entre 6°C et 12°C, les variations sont peu différentes pour l'imbibition du grain et les phénomènes d'hydrolyse. Seules les oxydations respiratoires sont plus importantes.

TABLEAU IV

Quantité de substances azotées et teneur en eau après 48 heures de germination.

N en mg pour 100 grains	6°C	12°C	25°C
N protéique	57,4	51,8	37,7
N sol. total	13,2	18,1	32,1
N des amino-acides	1,9	2,8	19,1
N des amides	1,8	6,4	4,5
N du p^te^ phospho-tungst.	4,3	3,3	3,2
N total	70	70	69,8
Teneur en eau p. 100 parties de subst. sèche	50	70	132

Les pertes en substance sèche sont d'autant plus fortes pour un même stade que la température est plus élevée par suite de l'hydrolyse

plus importante des glucides et de l'accélération des oxydations respiratoires.

La vitesse de la protéolyse est très voisine pour les températures de 6°C et 12°C, ainsi que la teneur en protéines non altérées par les hydrolyses. Par contre, à 25°C, l'hydrolyse des protéines est beaucoup plus rapide et plus intense et correspond à un accroissement de l'hydratation des tissus.

Très rapidement, la protéogenèse masque en partie l'intensité de la protéolyse dès que la température s'élève.

MOTHES (1933), puis, plus tard, GREGORY et coll. (1937) et VICKERY et coll. (1940) ont insisté sur le fait que la protéogenèse et la protéolyse sont des phénomènes continus dans les mêmes organes, le taux protéique mesuré correspondant au bilan entre les deux processus inverses.

La séparation dans les échantillons, de l'albumen et de la jeune plantule permet de faire la part revenant à la protéogenèse dans les organes axiaux et à la protéolyse dans l'albumen.

Dans le cas de germination effectuée à 25°C, la vitesse d'hydrolyse définie par les valeurs du rapport $\frac{\text{N protéique}}{\text{N org. soluble}}$ reste très rapidement constante dans l'albumen alors que celle de la protéogenèse s'accélère dans les organes axiaux.

Bien que les oxydations respiratoires augmentent avec la température, leur intensité est de peu d'importance dans les grains d'Orge.

La glutamine est toujours en quantité très faible et l'asparagine présente est beaucoup plus liée aux phénomènes d'hydrolyse qui en libèrent des quantités assez importantes à partir des protéines, qu'aux phénomènes respiratoires générateurs d'amides par oxydation des protides solubles.

Les valeurs du rapport $\frac{\text{N des amino-acides}}{\text{N des amides}}$ obtenues à 25°C confirment les observations de MET (1950) qui montre que, pour une germination de Blé effectuée à 18°C, l'intensité respiratoire est beaucoup plus intense pour la plantule que pour l'albumen.

Aux basses températures de germination, l'influence des oxydations des protides solubles peut être considérée comme négligeable dans les variations du métabolisme azoté.

L'observation des résultats obtenus montre que certaines formes azotées solubles n'ont pas été dosées dans les germinations, bien que leur présence ne soit pas négligeable. L'augmentation, au cours du temps, des quantités de l'azote précipité par le réactif phosphotungstique est importante et peut être imputée à des corps tels que les polypeptides, la choline, les uréines glyoxyliques, etc.

RÉSUMÉ

L'observation des variations du métabolisme azoté du grain d'Orge mis en germination à des températures variables, permet de distinguer un certain nombre de phénomènes fondamentaux.

L'augmentation de la proteolyse est en relation avec l'élévation du facteur thermique, sa vitesse étant très voisine à 6 et 12°C, ainsi que la teneur en protéines non altérées par les hydrolyses.

Très rapidement, la protéogenèse dans les organes axiaux masque en partie l'intensité de la proteolyse dès que la température s'élève.

Les oxydations respiratoires augmentent avec la température, mais leur intensité est toujours faible dans les grains d'Orge ; la glutamine est toujours en très faible quantité et l'asparagine présente est beaucoup plus liée aux phénomènes d'hydrolyse des protéines qu'aux phénomènes respiratoires générateurs d'amides.

Aux basses températures, l'influence des oxydations des protides solubles peut être considérée comme négligeable dans les variations du métabolisme azoté.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BACH (D.). — Le dosage de l'ammoniaque par entraînement à la vapeur d'eau dans le vide. *Bull. Sc. Pharmacol.*, **39**, 607-614, 1932.

CHIBNALL (A. C.). — Protein metabolism in the plant. Yale University Press. New Haven, 1939.

DELAUNAY (H.). — Recherches biochimiques sur l'excrétion azotée des Invertébrés. *Th. Doc. Sc. Nat.*, Paris, 1927.

DOMMERGUES (P.). — Action de la Colchicine sur l'Orge cultivée. *Ann. Amél. I. N. R. A.*, **1**, 295-331, 1951.

DUCET (G.). — Etude des variations des différentes formes de la choline au cours de la croissance de quelques végétaux. *Thèse Doc. Sc. Nat.*, Paris, 1949.

ECHEVIN (R.) et BRUNEL (A.). — Ureides et urée libre, dégradation des purines chez le *Soja hispida* Mnch. *C. R. Ac. Sc.*, Paris, **205**, 294-296, 1937.

GREGORY (F. G.) et SEN (P. K.). — Physiological studies in plant nutrition. VI. The relation of respiration rate to the carbohydrate and nitrogen metabolism of the Barbey leaf as determined by nitrogen and potassium deficiency. *Ann. Bot. n. s.*, **1**, 521-561, 1937.

LUGG (J. W.). — The representativeness of extracted samples and the efficiency of extraction of protein from the fresh leaves of plants ; and some partial analyses of the whole proteins of leaves. *Bioch. Journ.*, **33**, 110-122, 1939.

MEISS (A. N.). — The formation of asparagine in etiolated seedlings of *Lupinus albus* L. *Connecticut Agri. Sta.*, **553**, 1952.

MET (M.). — Etude de la respiration du Blé au cours d'une germination normale et pendant le traitement de vernalisation. *Rev. gén. Bot.*, **57**, 429-451, 1950.

MOTHES (K.). — Die Wakuuminfiltration im Ernährungsversuch (dargestelt an Untersuchungen über die Assimilation des Ammoniaks). *Planta*, **19**, 117-138, 1933.

MOYSE (A.). — Respiration et métabolisme azoté. (Etude de physiologie foliaire). Hermann et Cie, éd. Paris, 1950.

MOYSE (A.). — Le métabolisme protidique des plantes (2e partie). *Année biol.*, **27**, 581-650, 1951.

PAECH (K.). — Ueber die Regulation des Eiweissumsatzes ünd uber den Zustand der proteolytischen Fermente in der Plantzen. *Planta*, **24**, 78-129, 1935.

PALLADINE (W.). — Recherches sur la respiration des feuilles vertes et des feuilles étiolées. *Rev. gén. Bot.*, **5**, 449-473, 1893.

PRIANISCHNIKOV (D.). — Ueber den Einfluss der Temperatur auf die Energie des Eiweisszerfalls. *Ber. d. d. Bot. Ges.*, **18**, 285-291, 1900.

PUCHER (G. W.), VICKERY (H. B.) et LEAVENWORTH (C. S.). — Determination of ammonia and of amid nitrogen in plant Tissue. *Ind. and eng. chem.*, **7**, 152-156, 1935.

RAUTANEN (N.). — On the synthesis of the amino-acids in green plants. Thèse Phil. Univ. Helsinki, 1948.

VAN SLYKE (D. D.). — A method of quantitative determination of aliphatic amino-group. I. *Journ. Biol. Chem.*, **9**, 187-207, 1911.

VAN SLYKE (D. D.). — The quantitative determination of aliphatic amino-group. II. *Journ. Biol. Chem.*, **12**, 275-284, 1912.

VICKERY (H. B.), PUCHER (G. W.), CLARK (H. E.), CHIBNALL (A. C.) et WESTALL (R. G.). — The determination of glutamine in the presence of asparagine. *Bioch. Journ.*, **29**, 2710-2720, 1935.

VIRTANEN (A. I.) et LAINE (T.). — Biological synthesis of amino-acids from atmospheric nitrogen. *Nature Londres*, **141**, 748-749, 1938.

VIRTANEN (A. I.), ARHILM (A. A.), DUNDMANN (J.) et JAENNES (L.). — Verkommen und Bedeutung der Oxalessigsäure in grünen Pflantzen. *Journ. Prakt. chem.*, **162**, 71-90, 1943.

YEMM (E. W.). — The synthesis and interconversion of amino-acids in barley seedlings. *Rapp. et commun. Cong. Int. Bot. Paris* sect. **11**, 44-45, 1954.

YOVANOVITCH (A.). — Microdosage de l'ammoniaque. Application au dosage de l'ammoniaque urinaire. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **7**, 665-672, 1925.

CHRONIQUE DES LIVRES

BONNER (John Tyler). — **The evolution of development.** (L'évolution du développement). Cambridge, University Press, 1958, 103 p.

Cet ouvrage est la publication de trois conférences faites à l'Université de Londres par J. T. BONNER, le spécialiste bien connu des Myxobactéries.

Il déclare lui-même qu'il a cherché à présenter sous un jour nouveau ou inhabituel des idées familières à chacun sur le développement en général et son évolution. Ce livre comprend trois parties : l'origine du développement, le fonctionnement du développement, l'extension du développement.

L'apparition et le développement d'êtres vivants n'a pu avoir lieu que par autoreproduction de structures et leur diversification s'est produite par l'intermédiaire de variations dans ce phénomène, les individus ainsi formés ont été triés par la sélection naturelle, qui ne permet le maintien que des individus les mieux adaptés à l'environnement. Telles sont les idées développées dans ce premier chapitre. L'auteur y examine, à l'aide d'exemples très variés, pris surtout chez les microorganismes, comment des structures complexes ont pu prendre naissance, à partir d'une cellule homogène à l'aide des trois processus suivants : 1° croissance, c'est-à-dire augmentation de matière vivante; 2° actions morphogènes dues à des migrations de protoplasme et 3° différentiations des différentes parties de l'organisme. Les exemples tirés du cycle évolutif des *Acrasiales* sont très suggestifs car ils présentent des cas extraordinaires de formation d'individus différenciés par aggrégation de cellules libres.

Le second chapitre renferme beaucoup plus d'hypothèses. L'auteur cherche à y expliquer comment des différences morphologiques et fonctionnelles ont pu s'établir entre les différentes parties d'un individu homogène à l'origine par ségrégation d'unités cytoplasmiques. Trois processus ici encore peuvent leur donner naissance : 1° gradients provoqués par les causes externes (position asymétrique de l'œuf) ou internes (compétition enzymatique par un substrat). 2° Induction et 3° polarité. Les exemples tirés du transport polaire d'auxine chez les plantes ou de la division des cinétosomes des ciliés ne sont pas très convainquants. Là encore l'évolution des myxobactéries et leur comparaison avec le développement d'un embryon sont très frappantes.

Le troisième chapitre qui traite des interactions entre les différentes parties de l'individu et du comportement est plus général. Il est illustré lui aussi par d'admirables exemples de réactions hormonales en chaine, tirés des travaux de RAPER sur la conjugaison des *Achlya* qui sont audacieusement comparés au comportement sexuel de certains poissons étudiés par TINBERGEN. Il se termine par des idées très générales sur la notion de territoire chez les poissons et les oiseaux. Cet ouvrage renferme sous forme condensée énormément d'idées et d'hypothèses très bien présentées et illustrées.

G. M.

MASCRÉ (M.). — **Cours de Botanique générale. Tome III. Physiologie et biologie des plantes vasculaires. Ire partie. Nutrition et métabolisme.** Paris. Sedes, 1958, 318 p.

Cet ouvrage, partie d'une réédition du Cours de Botanique générale de D. BACH, comporte de nombreux remaniements dus aux progrès nombreux dans tous les domaines de la Nutrition et du Métabolisme. L'auteur a adopté un plan d'étude en 5 parties : principes immédiats (description, propriétés générales), absorption et circulation des aliments et métabolites, assimilation et élaboration (anabolisme) dégradation (catabolisme), notions fondamentales sur la nature et le rôle des diverses formes de l'énergie qui interviennent dans la vie de la plante. En fait, sur les 19 chapitres de l'ouvrage, le catabolisme en compte seulement 2 ; l'absorption et la circulation des métabolites 4 ; les phénomènes énergétiques 1, tandis que 12 chapitres sont consacrés à la description des principes immédiats et à l'anabolisme glucidique, lipidique et azoté.

Il fautre marquer que cet ouvrage est un cours d'initiation, professé à la Faculté de Pharmacie de Paris, et que l'enseignement détermine un choix pédagogique. De ce point de vue, l'ensemble de cette première partie du tome III est certainement un bon ouvrage pour les étudiants.

L'auteur donne un aperçu des hypothèses récentes, aussi bien pour la photosynthèse que pour la formation des lipides ou celle des protéines, d'une manière assez succinte mais exacte. Certains composés sont étudiés d'une manière plus détaillée, tels les alcaloïdes, par rapport aux 2 pages consacrées aux stéroïdes, mais cela correspond à une nécessité pour l'enseignement de pharmacie.

C'est donc un ouvrage utile à l'étudiant plutôt qu'au chercheur, mais sa lecture facile peut permettre une mise au courant rapide pour ceux qui désirent acquérir les notions de physiologie et de biologie végétales.

La présentation est bonne, les figures, les formules sont claires et un erratum est ajouté. Nous n'avons cependant pas compris le changement demandé à la p. 244 : le remplacement de formules nous semble contraire au texte. Quelques erreurs typographiques (un 4 qui devrait être un 5, page 8 ; OCHROA pour OCHOA, page 219, un 15 (page 117, etc.), disparaîtront certainement dans la prochaine édition.

G. DU

Le Directeur-Gérant : B. LACLAVIÈRE.

Imprimerie BUSSIÈRE à Saint-Amand (Cher), France. — 19-6-1959.
Dépôt légal : 2e trimestre 1959 *N° d'impression : 381*

TARIF DES ABONNEMENTS POUR 1959

	FRANCE	ÉTRANGER	LE N°
SÉRIE A. — AGRONOMIE	4.000	4.600	800
SÉRIE A *bis.* — PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE	1.500	1.900	500
SÉRIE B. — AMÉLIORATION DES PLANTES	2.600	3.000	800
SÉRIE C. — ÉPIPHYTIES	2.600	3.000	800
SÉRIE C *bis.* — ABEILLE	1.800	2.100	600
SÉRIE D. — ZOOTECHNIE	1.800	2.100	600
SÉRIE E. — TECHNOLOGIE	2.600	3.000	800

Chaque demande de changement d'adresse doit être accompagnée de 40 fr. en timbres-poste.

Les demandes d'abonnements doivent être adressées au Régisseur des Publications de l'Institut National de la Recherche Agronomique, 149, rue de Grenelle - PARIS-7e. C.C.P. : PARIS, 9064-43. Elles peuvent être également souscrites par l'intermédiaire de libraires dans les conditions habituelles.

TABLE DES MATIÈRES